



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN PACIENTES CON
CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO: VALOR DEL ESTUDIO
NO DIRIGIDO DEL TRANSCRIPTOMA IMPLICADO EN LA RESPUESTA A
CISPLATINO EN CÁNCER DE PULMÓN.**

Memoria presentada para la obtención del Grado de Doctor en Medicina por

Elena Hernández Agudo

Directores:

Dra. Paloma Cejas Guerrero

Dr. Javier de Castro Carpeño

Dr. Jaime Feliu Batlle

Madrid, 2013

AGRADECIMIENTOS:

Llegados a la penúltima parada de este viaje, no puedo por menos que reconocer y agradecer la colaboración, ayuda y empuje que he podido encontrar durante todo el camino que ha supuesto la realización de este trabajo.

A la Dra. Paloma Cejas, por su gran implicación en este proyecto, que no entiende de distancias o tareas pendientes. Siempre dispuesta a encontrar un momento para discutir y orientar el trabajo desde el otro lado del Atlántico, ha sido un motor fundamental por su compromiso y dedicación.

Al Dr. Javier de Castro, por sus sabios consejos y experiencia que, ya desde el inicio de mi formación como oncóloga, ha sabido transmitirme y que han sido de gran valor en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jaime Feliú, por su confianza e interés en el desarrollo de este estudio, reflejo de su vocación por una investigación oncológica de calidad.

A la Dra. Rosario Perona, por su amable y desinteresada colaboración en la realización de los estudios de sensibilidad a cisplatino, así como por su asesoramiento en la interpretación de los resultados obtenidos.

Al Dr. José Javier Sánchez, por su inestimable ayuda con el análisis estadístico de los datos, por su paciencia y su disponibilidad, y por esa labor docente que siempre ha encontrado hueco en nuestras reuniones.

Al Dr. Juan Moreno, por su ayuda y por hacer tantas veces de *alter-ego* de Paloma, sobre todo en los primeros meses tras su partida.

Al Servicio de Anatomía Patológica, por su rigurosa aportación en la selección de los casos y las muestras empleadas en este trabajo.

A las técnicas del laboratorio de Oncología Traslacional del hospital La Paz, Esther, María y Rocío, por su labor en el procesamiento de las muestras empleadas.

A mis anteriores compañeros del Servicio de Oncología Médica y del Laboratorio de Oncología Traslacional del Hospital La Paz y del Hospital Infanta Sofía, así como a mis actuales compañeros de la Unidad de Cáncer de Mama del CNIO, por su apoyo cercano y siempre presente durante la realización de este proyecto, así como su disponibilidad y sincero ofrecimiento en toda ocasión.

A los Dres. Jorge Barriuso y Marta Mendiola, que han sido un verdadero ejemplo a seguir en constancia y perseverancia, y que siempre me han demostrado su confianza. Sin su impulso, ánimos y consejos, probablemente habría tirado la toalla mucho antes de siquiera vislumbrar el fin del camino.

A los Dres. María Sereno e Iker Sánchez, por compartir conmigo su vocación investigadora y apoyar mi desarrollo profesional. Y por esas apretadas agendas en las que siempre han encontrado un hueco para mí.

Finalmente, deseo agradecer a mi familia toda la ilusión, paciencia y apoyo que me han transmitido desde el inicio de este trabajo. A Pepe, mi abuelo, por enseñarme desde siempre que nada se consigue sin esfuerzo, y que no hay mayor recompensa que la del trabajo bien hecho. A mis padres, Antonio y Lucía, por poner todo su esmero en mi educación, por animarme siempre a llegar más alto y enseñarme a no desesperar en el intento, y por ser el reflejo constructivo de todas mis decisiones. A mi hermano Javier, siempre prudente, que ha sabido escucharme y aportar su punto de vista, no por más joven menos valioso, en todo cuanto he podido necesitar. A mis tíos y primos, por esa “gran familia” que con calor y alegría hacéis brillar hasta el día más gris y despejáis el pensamiento más nublado. Y a Jorge, por tu incondicional compañía, paciencia y ánimo sin fisuras. Gracias por ser mi contrapunto, mi equilibrio, y el compás de guía para mantener firme el rumbo durante todo este tiempo.

Índice:

1. Índice de figuras.....	3
2. Índice de tablas.....	4
3. Introducción.....	5
3.1 Epidemiología.....	7
3.2 Factores de riesgo.....	8
3.3 Anatomía Patológica.....	8
3.4. Estadificación TNM y pronóstico.....	10
3.5 Aproximación general al tratamiento.....	11
3.6 Marcadores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento.....	15
3.6.1. Oncogenes.....	15
3.6.2. Genes supresores de tumores.....	19
3.6.3. Genes de reparación del ADN.....	21
3.6.4. Genes de invasión tumoral y metástasis.....	21
3.6.5. Angiogénesis e inflamación.....	23
3.7. Mecanismos moleculares de respuesta y resistencia a derivados del platino.....	24
3.7.1. Captación y excreción celular.....	26
3.7.2. Detoxificación intracelular.....	27
3.7.3. Sistemas de reparación del ADN.....	28
3.7.4. Apoptosis y ciclo celular.....	34
3.7.5. Señalización celular.....	40
3.8 Perfiles de expresión génica.....	46
3.8.1. <i>Microarrays</i>	47
3.8.2. SAGE.....	48
3.8.3. Perfiles pronósticos.....	49
3.8.4. Perfiles predictivos de respuesta a quimioterapia.....	56
4. Hipótesis y objetivos.....	61
5. Material y métodos.....	65
5.1. Estudio de sensibilidad a cisplatino, análisis SAGE y confección de las tarjetas de qPCR.....	68
5.1.1. Pacientes y muestras.....	68
5.1.2. Estudio <i>in vitro</i> de sensibilidad a cisplatino.....	68
5.1.3. Análisis SAGE.....	69
5.1.4. Confección de las tarjetas de qPCR.....	72

5.2. Análisis de expresión en pacientes con CPNM avanzado.....	72
5.2.1. Pacientes y muestras.....	72
5.2.2. Procesamiento de las muestras.....	75
5.2.3. Reacción de qPCR.....	75
5.2.4. Análisis estadístico.....	76
6. Resultados.....	79
6.1. Estudio de sensibilidad a cisplatino.....	81
6.2. Análisis SAGE.....	82
6.3. Confección de las tarjetas de qPCR.....	85
6.4. Estudio de expresión génica en pacientes con CPNM avanzado.....	87
6.4.1. Datos clínicos.....	87
6.4.2. Análisis pronóstico en función de factores clínico-patológicos al diagnóstico.....	89
6.4.3. Análisis pronóstico en función de la respuesta a quimioterapia basada en platino.....	92
6.4.4. Análisis de expresión génica mediante qPCR.....	94
6.4.5. Modelo pronóstico basado en la expresión génica.....	95
6.4.6. Análisis de la expresión génica en relación con la respuesta a quimioterapia.....	99
7. Discusión.....	101
7.1. Estudios de sensibilidad a cisplatino y análisis SAGE.....	103
7.2. Selección génica para las tarjetas qPCR	107
7.3. Estudio de expresión génica en pacientes con CPNM avanzado....	114
7.3.1. Características de la muestra y representatividad.....	114
7.3.2. Aplicabilidad de los resultados.....	115
7.3.3. Muestras biológicas.....	116
7.4. Modelo pronóstico basado en la expresión génica.....	117
7.4.1. EGR1.....	117
7.4.2. ERCC1.....	124
7.5. Expresión génica y respuesta a quimioterapia.....	129
7.6. Perfil pronóstico basado en la expresión génica: limitaciones y futuras líneas de trabajo.....	130
8. Conclusiones.....	137
9. Anexos.....	141
10. Bibliografía.....	155
11. Clave de abreviaturas.....	177

Índice de figuras:

Figura 1. Mecanismos moleculares mediadores de la respuesta a platino.....	25
Figura 2. Mecanismos de resistencia a platino.....	26
Figura 3. Sistemas de reparación del ADN principales en la reparación del daño por cisplatino.....	29
Figura 4. Esquema de la técnica de <i>microarrays</i>	47
Figura 5. Esquema de la técnica de SAGE.....	70
Figura 6. Estudio ontológico de rutas para los genes del estudio de SAGE (GeneMania).....	84
Figura 7. Kaplan-Meier SLP y SG (todos los pacientes).....	87
Figura 8. Kaplan-Meier SLP y SG vs sexo.....	89
Figura 9. Kaplan-Meier SLP y SG vs edad.....	89
Figura 10. Kaplan-Meier SLP y SG vs ECOG.....	90
Figura 11. Kaplan-Meier SLP y SG vs histología.....	90
Figura 12. Kaplan-Meier SLP y SG vs estadio.....	90
Figura 13. Kaplan-Meier SLP y SG vs respuesta a quimioterapia.....	93
Figura 14. Kaplan-Meier SLP y SG vs <i>score</i> pronóstico.....	97
Figura 15. Implicación de EGR1 en la angiogénesis mediada por FGF y PDGF.....	121
Figura 16. Test de la consistencia en el ciclo celular.....	122

Índice de tablas:

Tabla 1. Casos seleccionados para el estudio de SAGE.....	82
Tabla 2. Análisis SAGE.....	82
Tabla 3: Rutas halladas en el estudio GeneMania a partir de los genes SAGE.....	83
Tabla 4. Datos de expresión por SAGE de los 6 genes seleccionados.....	85
Tabla 5. Genes seleccionados del estudio SAGE.....	85
Tabla 6. Genes escogidos de la literatura.....	86
Tabla 7. Genes <i>housekeeping</i>	87
Tabla 8. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	88
Tabla 9. Análisis multivariante para SLP según factores clínico-patológicos al diagnóstico.....	91
Tabla 10. Análisis multivariante para SG según factores clínico-patológicos al diagnóstico.....	92
Tabla 11. Datos de expresión génica por qPCR (17 genes)	94
Tabla 12. Análisis univariante de la SLP y la SG según los niveles de expresión génica (17 genes).....	95
Tabla 13. Perfil pronóstico de dos genes.....	96
Tabla 14. SLP y SG según puntuación <i>score</i>	97
Tabla 15. Análisis multivariante para SLP según factores clínico-patológicos al diagnóstico y puntuación <i>score</i>	98
Tabla 16. Análisis multivariante para SG según factores clínico-patológicos al diagnóstico y puntuación <i>score</i>	98
Tabla 17: Tabla 16: análisis univariante para la respuesta a quimioterapia según los niveles de expresión génica (17 genes).	99
Tabla 18: Análisis multivariante (regresión logística) para la respuesta a quimioterapia según la expresión de los genes seleccionados.....	100
Tabla 19: Genes seleccionados para qPCR procedentes de SAGE y valor en CPNM	109
Tabla 20: Genes seleccionados para qPCR escogidos de la literatura y valor en CPNM.....	113

Introducción

1. EPIDEMIOLOGIA:

El cáncer de pulmón (CP) es el tumor maligno más frecuentemente diagnosticado en el mundo. Con una incidencia global aproximada de 1,61 millones de casos al año (12,7 % de todos los casos de cáncer), y una mortalidad estimada en 1,38 millones de muertes al año (18,2 % del total de muertes por cáncer), representa un problema sanitario de especial envergadura en el momento actual. Esta relevancia es especialmente notoria en los países desarrollados donde el CP alcanza las mayores tasas de incidencia. No obstante, en estos países se está registrando una tendencia al declive en su incidencia, mientras que se ha observado un importante aumento de esta neoplasia en los países en vías de desarrollo desde 1980(1).

En Europa, se estima que de los 3.2 millones de casos de cáncer diagnosticados en 2008, 391.000 (un 12,2% del total) correspondieron a casos de CP, siendo el tercer tumor en frecuencia de diagnóstico tras el cáncer colorrectal (13,6%) y el de mama (13,1%). Este tumor se sitúa en cabeza de la mortalidad por cáncer en Europa, con 342.000 muertes atribuibles (un 20% del total).

En España, los datos epidemiológicos más recientes son los relativos al año 2008. En ese año, el número de fallecimientos por CP fue de 20.195, 17.146 varones y 3.049 mujeres (2). Las cifras muestran una tendencia temporal ascendente, si bien el porcentaje de aumento va siendo menor. Las tasas de incidencia ajustadas, muy próximas a las de mortalidad, han empezado a descender en varones. (3). Para mujeres, sin embargo, la tasa de mortalidad, inferior a la de la media europea, está experimentando un incremento progresivo. Ambos hechos probablemente son correlativos a la evolución en los patrones de consumo de tabaco en nuestro país (4). En cuanto a la edad al diagnóstico, hay una tendencia clara al aumento. En España los casos de CP diagnosticados en mayores de 70 años superan el 50% de todos los casos, y la edad media al diagnóstico se aproxima a los 70 años en la mayoría de los registros (5). Por tipos histológicos, hay una tendencia al aumento de los adenocarcinomas de pulmón y a una disminución del subtipo epidermoide. Aún así, la estirpe epidermoide es la más prevalente en España, con un 37,7% de los casos en 2003. El carcinoma de pulmón microcítico representa en torno al 20% de los tumores de pulmón diagnosticados en nuestro país (3, 5).

El CP es una de las neoplasias más letales que existen. Muestra de ello es la tasa de supervivencia absoluta a 5 años tras el diagnóstico, próxima al 10% en nuestro país, así como la escasa diferencia entre la tasa de incidencia registrada y la de prevalencia, de unos 24.000 casos/año. Estos índices han permanecido estables o con muy leves variaciones tanto en España como en el resto de países desarrollados a pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento de este tumor en las últimas décadas, lo que convierte al CP en una cuestión de indudable importancia en materia de prevención y salud pública (3, 4) .

2. FACTORES DE RIESGO:

El consumo de tabaco es el factor causal más importante del CP, y contribuye a la aparición de aproximadamente el 90% de todos los casos de cáncer en esta localización (6). Otros factores de riesgo, como los carcinógenos medioambientales o los condicionantes genéticos y hereditarios de predisposición, son responsables de un número más minoritario de casos de esta neoplasia (7) (8). Finalmente, ciertas enfermedades pulmonares benignas preexistentes, como la fibrosis intersticial difusa, la asbestosis o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) pueden producir un incremento del riesgo de CP (9, 10) .

3. ANATOMIA PATOLOGICA

El estudio anatomopatológico del CP ha experimentado un importante cambio en los últimos años. El desarrollo de la citopatología y el estudio de las lesiones preneoplásicas atípicas han evolucionado junto con las nuevas técnicas de imagen y los métodos de obtención de muestras para el diagnóstico precoz de esta patología. No obstante, la biopsia y el estudio de la pieza quirúrgica siguen siendo los pilares fundamentales del diagnóstico. La clasificación histológica más empleada es la desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), basada en la microscopía óptica, que ha sido actualizada en 2004 (11). Los cuatro subtipos principales de CP, que representan más del 95% de los casos, son los siguientes: Carcinoma epidermoide (20-30%), adenocarcinoma (30-40%), carcinoma de célula

grande (10%) y carcinoma de célula pequeña o microcítico (20%). Los tres primeros subtipos se agrupan dentro del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), y se distinguen del carcinoma de pulmón microcítico (CPM) por ser este último una entidad diferente de los otros tres subtipos en cuanto a sus características biológicas, comportamiento clínico y manejo terapéutico.

3.1. Carcinoma epidermoide:

El carcinoma epidermoide o escamoso es la variedad más frecuente en los países occidentales y también el más relacionado con el consumo de tabaco. Clásicamente son tumores de localización central, y suelen extenderse *in situ* a lo largo de la mucosa bronquial. Son localmente agresivos, produciendo afectación por contigüidad y crecimiento endobronquial. Disemina sobre todo por vía linfática, y produce metástasis a distancia más tardíamente que otros subtipos histológicos. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, expresan queratinas de alto peso molecular, como las citoqueratinas 5/6, CEA y p63, así como el factor-1 de transcripción tiroidea (TTF-1).

3.2. Adenocarcinoma:

También de estirpe epitelial, presenta diferenciación glandular o producción de mucina. Se origina en el epitelio de los alvéolos y de las células glandulares mucosas de los bronquios. Es el tipo histológico más frecuente en muchos países, sobrepasando al carcinoma epidermoide, y también es el más frecuente en mujeres. Es el menos relacionado con el tabaco, si bien su incidencia sigue siendo mayor en fumadores. Se trata de tumores únicos o múltiples, que se localizan en áreas periféricas del pulmón. Tienden a metastatizar a distancia por vía hemática. Tienen un patrón de positividad inmunohistoquímica para la citoqueratina 7, la proteína del surfactante y TTF-1. La variante bronquioloalveolar presenta unas características propias morfológicas y biológicas (son tumores con un pronóstico generalmente favorable) que han propiciado su clasificación como entidad independiente.

3.3. Carcinoma de células grandes:

Se trata de carcinomas anaplásicos formados por células grandes y poligonales. Probablemente son carcinomas epidermoides y adenocarcinomas

imposibles de identificar como tales debido a la pobre diferenciación, por lo que su diagnóstico suele ser de exclusión frente a los otros dos subtipos. Es el tercer tipo histológico en frecuencia, y suele presentarse en forma de masa voluminosa periférica, con afectación hiliar. Por lo general son tumores de crecimiento rápido y elevada tendencia a la diseminación ganglionar y hematógena, por lo que se asocian a mal pronóstico.

3.4. Carcinoma microcítico:

Junto con el carcinoma epidermoide, es la variedad histológica más relacionada con el consumo de tabaco. Se localizan fundamentalmente en la vía aérea central, y con frecuencia se identifica un gran componente necrótico. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, muestran inmunorreactividad para queratina y antígeno epitelial de membrana en prácticamente el 100% de los casos.

Como ya se ha mencionado, el cáncer de pulmón microcítico presenta características biológicas, clínicas y terapéuticas diferenciales con respecto al cáncer de pulmón no microcítico. Es en este último grupo de tumores (CPNM) en el que se centra el presente trabajo.

4. ESTADIFICACION TNM Y PRONOSTICO DEL CARCINOMA DE PULMON NO MICROCITICO :

El sistema de estadificación TNM está aceptado internacionalmente para la estadificación del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La estadificación obtenida mediante este sistema determina la extensión de la enfermedad y es el factor más importante correlacionado con el pronóstico. Además, permite dividir a los pacientes en distintos subgrupos con opciones terapéuticas diferentes. La séptima edición del sistema TNM, emitida en 2007, es la versión más reciente (anexo 1)(12).

5. APROXIMACION AL TRATAMIENTO DEL CANCER DE PULMÓN NO MICROCITICO:

5.1. Tratamiento según estadios

El tratamiento de elección para los pacientes con CPNM en estadios tempranos (I y II) es la resección quirúrgica (13). Posteriormente, la administración de quimioterapia adyuvante basada en platino ha demostrado una mejoría en la supervivencia global en los pacientes con enfermedad estadio II, mientras que no está claro su papel en los estadios IB (14). En aquellos pacientes no candidatos a cirugía, el tratamiento radioterápico, ya sea convencional o en las nuevas modalidades de radiocirugía estereotáxica o radiofrecuencia ha demostrado utilidad como tratamiento local (15).

El grupo de pacientes con estadio III es un grupo muy heterogéneo donde pueden contemplarse diversas aproximaciones:

- Estadio IIIA T3N1: El manejo inicial de estos pacientes debe contemplar la resección quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante basada en platinos. En el caso de tratarse de un tumor del *sulcus* superior (tumor de Pancoast), debe comenzarse el tratamiento por quimioterapia y radioterapia concomitante y valorar la cirugía en un segundo tiempo.
- Estadio IIIA con afectación ganglionar N2 no voluminosa (menos de tres estaciones ganglionares, o única menor de 2 cm), puede plantearse tratamiento quimioterápico de inducción seguido de cirugía (16), siempre que ésta no sea una neumonectomía derecha, en estos casos se planteará tratamiento con quimio y radioterapia (ver abajo).
- En el estadio IIIA con enfermedad N2 voluminosa o no candidatos a cirugía, se optará en primera instancia por la quimioterapia y radioterapia concomitante, con para controlar precozmente la enfermedad micrometastásica e intentar la erradicación local del tumor. La administración concurrente mejora la supervivencia con respecto a la administración secuencial de ambos tratamientos (17, 18).

-
- En cuanto al estadio IIIB, la opción principal es el tratamiento con quimioterapia y radioterapia, de forma concomitante (19).

En los pacientes con CPNM estadio IV, el tratamiento quimioterápico sistémico con fin paliativo incrementa la supervivencia y mejora la calidad de vida, incluso en pacientes ancianos o con regular estado general. Tanto el empleo de dobletes con o sin derivados del platino, como las monoterapias con los agentes quimioterápicos más modernos, han demostrado una ventaja significativa con respecto al tratamiento sintomático. De este modo, para pacientes con buen estado general, la tasa de respuesta es de entre el 7 y el 40% con medianas de supervivencia de 7-8 meses y 20% de supervivientes al año, frente a los 4-5 meses de supervivencia mediana, y 10% de supervivientes año en pacientes que reciben únicamente tratamiento de soporte (20) (21-23). Desde hace algunos años, el horizonte terapéutico de estos pacientes se está ampliando enormemente con la incorporación de nuevos agentes biológicos frente a dianas específicas, que pueden ser usados en combinación con quimioterapia o en monoterapia.

5.2. Tratamiento sistémico en CPNM

Los esquemas de quimioterapia basados en agentes derivados del platino, fundamentalmente combinaciones en doblete con otros citotóxicos, constituyen la base para la terapia sistémica del CPNM, tanto en el entorno adyuvante, como en la neoadyuvancia o en la enfermedad diseminada. El empleo de monoterapias se reserva para pacientes frágiles o tras fallo a primera línea de tratamiento. Los agentes biológicos dirigidos frente a diana constituyen en algunos casos un complemento a la quimioterapia en la enfermedad diseminada (antiangiogénicos), mientras que en otros casos se emplean en monoterapia cuando el tumor presenta marcadores biológicos de respuesta, como sucede en el caso de los anti-EGFR o de los inhibidores de la proteína de fusión EML4-ALK.

5.2.1. Quimioterapia citotóxica:

Existen varios agentes quimioterápicos que han demostrado eficacia en el tratamiento del CPNM. Los más importantes son los derivados del platino: cisplatino y carboplatino. Estos dos fármacos constituyen la base de la mayor parte de los

regímenes de combinación empleados en el tratamiento de esta enfermedad. Otros quimioterápicos empleados en CPNM son los taxanos (docetaxel y paclitaxel), la gemcitabina, la vinorelbina, o el pemetrexed. Suelen emplearse en combinación con derivados del platino, aunque también pueden emplearse en monoterapias o en combinaciones sin platino, por ejemplo en el tratamiento de pacientes frágiles.

Para el CPNM en el entorno adyuvante, el empleo de esquemas de combinación con cisplatino ha demostrado un incremento en la supervivencia global (SG) de los pacientes en estadios II y IIIA resecados, el beneficio es más dudoso para los pacientes con estadio IB. (14, 24-26). En cuanto a su empleo en neoadyuvancia, existen varios estudios que analizan su eficacia con resultados dispares (27) (28, 29), aunque un metaanálisis realizado a partir de algunos estudios de pequeño tamaño sugiere un beneficio en la supervivencia global (30).

En cuanto a la enfermedad avanzada, la quimioterapia prolonga la supervivencia y mejora el control sintomático y la calidad de vida de los pacientes (23). Los dobletes de platino con alguno de los quimioterápicos de tercera generación (taxanos, gemcitabina, vinorelbina, pemetrexed), son más eficaces que cisplatino en monoterapia o en combinación con quimioterápicos clásicos, así como frente a los regímenes que no contienen platino (31). El empleo de tripletes de quimioterapia no ha demostrado beneficio en supervivencia frente al empleo de dobletes, y sí una mayor toxicidad (32).

El tratamiento quimioterápico con dobletes de platino en CPNM avanzado consigue tasas de respuesta (TR) del 20-35%, supervivencia libre de progresión (SLP) de 4-6 meses y supervivencia global (SG) de 8-10 meses, con un 30-40% de pacientes vivos transcurrido un año. Los regímenes basados en cisplatino parecen ser algo más eficaces que los basados en carboplatino en términos de SG (33). *A priori*, no hay grandes diferencias en la eficacia al variar el fármaco a combinar con platino (34), salvo para la combinación cisplatino-pemetrexed, de eficacia superior frente a cisplatino-gemcitabina en pacientes con CPNM no epidermoide (35). El número de ciclos a administrar oscila entre 4 y 6 ciclos, dependiendo de si se obtiene una estabilización de la enfermedad o una respuesta parcial. Un mayor número de ciclos no mejora la SG y sí aumenta la toxicidad y empeora la calidad de vida (36).

La toxicidad de los regímenes de quimioterapia basados en platino es un factor importante a considerar en el momento de decidir la terapia a administrar. Este aspecto adquiere una especial relevancia en la enfermedad metastásica, donde la preservación de la calidad de vida del paciente es uno de los objetivos principales del tratamiento. Los principales efectos secundarios del cisplatino son la emesis, la toxicidad hematológica, la nefrotoxicidad y la neurotoxicidad (37).

5.2.2. *Fármacos frente a dianas moleculares:*

En los últimos años se han desarrollado agentes farmacológicos frente a dianas biológicas y rutas de señalización intracelular cuya participación en el desarrollo y la progresión del CPNM es bien conocida. Estos fármacos se emplean fundamentalmente en el tratamiento del CPNM avanzado. Ofrecen una mejoría en las tasas de eficacia de la quimioterapia estándar, con una toxicidad específica de clase que es manejable en la mayor parte de los casos. Las estrategias más desarrolladas en CPNM son la inhibición de la señalización de la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la regulación de la neoangiogénesis. Con respecto a la inhibición de la vía de señalización de EGFR, los inhibidores de tirosina kinasa de este receptor, gefitinib y erlotinib, se han incorporado al tratamiento en primera línea del CPNM avanzado con mutación en el dominio tirosínkinasa del EGFR, proporcionando un aumento en la TR y en la SLP de los pacientes en comparación con la quimioterapia estándar, si bien no se ha demostrado que aumenten la SG (38) (39). En cuanto a la inhibición de la neoangiogénesis tumoral, la adición de bevacizumab, un anticuerpo monoclonal con acción frente al eje proangiogénico VEGF-VEFR, a la quimioterapia estándar en el tratamiento de primera línea de CPNM con histología no escamosa produce un aumento en la TR, SLP y SG cuando se compara con quimioterapia sola (40) (41). Otras estrategias en fase más precoz de desarrollo incluyen la inhibición múltiple de receptores tirosínkinasa y de proteínas tirosínkinasa intracelulares, la inhibición del factor de crecimiento insulínico, los inhibidores de metaloproteinasas, de las kinasas del ciclo celular, del proteasoma o de las deacetilasas de histonas, la inhibición de la kinasa de fusión EML4-ALK, o el desarrollo de vacunas frente a las células tumorales.

6. MARCADORES MOLECULARES PRONOSTICOS Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TRATAMIENTO EN CPNM.

El abordaje tradicional para la evaluación del pronóstico en CPNM, al igual que en el resto de tumores sólidos, comprende fundamentalmente la evaluación de los datos clínico-patológicos al diagnóstico. El estadio de la enfermedad es el factor clínico más relevante, aunque también son importantes el estado general del paciente, la pérdida de peso, la presencia de síntomas o las características concretas de la presentación metastásica (número y localización de las metástasis). Los factores anatomopatológicos, como el grado de diferenciación tumoral o el subtipo histológico, pueden ayudar a definir el pronóstico de un paciente concreto. En los últimos años, gracias al desarrollo en la investigación molecular del cáncer, han aparecido nuevos factores moleculares y génicos potencialmente determinantes del pronóstico de la enfermedad y de la respuesta a los tratamientos empleados, algunos de ellos podrían representar además dianas específicas para el desarrollo de nuevas terapias.

6.1. Oncogenes:

Los oncogenes son homólogos de genes necesarios para el funcionamiento celular, generalmente asociados a procesos de crecimiento y proliferación, en los que se produce un cambio mutacional que provoca su activación constitutiva y una ganancia de función.

6.1.1. *Gen de fusión EML4-ALK:*

En algunos pacientes con CPNM, se ha demostrado la formación de un gen de fusión a partir del gen de la proteína EML4 (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) con el gen de la kinasa del linfoma anaplásico ALK (*anaplastic lymphoma kinase*). La proteína quimérica resultante contiene el dominio intracelular tirosínkinasa de ALK. EML4 media la dimerización de ALK independiente de ligando, consiguiendo así la activación constitutiva de esta kinasa. En cultivos celulares, esta proteína posee una potente actividad oncogénica, y en modelos animales origina la aparición de adenocarcinoma de pulmón (42).

Los tumores pulmonares que presentan esta proteína de fusión son característicamente adenocarcinomas, especialmente de células en anillo de sello o

patrón acinar, que aparecen en personas jóvenes con muy escasa o nula exposición al tabaco. Estos tumores, que representan en torno al 7% de todos los tumores de pulmón, son especialmente sensibles a la inhibición selectiva de la kinasa ALK. Crizotinib es un potente inhibidor de la actividad de ALK, produciendo el arresto de las células tumorales en fase G1-S del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. El tratamiento con este fármaco en pacientes con CPNM que presentan el gen de fusión está siendo investigado actualmente, con resultados prometedores (43)(44) .

6.1.2. *K-ras y p21ras*:

Los genes ras (H-ras, N-ras y K-ras) se expresan de forma universal en las células de los mamíferos, y regulan las vías de señalización responsables del crecimiento celular. Las proteínas a las que dan lugar, llamadas p21ras, son proteínas G que se encuentran unidas a la zona citoplasmática de la membrana celular. Estas proteínas se activan y desencadenan la cascada de efectores intracelulares mediante la unión a GTP. La hidrólisis de GTP, mediante proteínas con actividad GTPasa o mediante la actividad GTPasa de la propia proteína ras, hace que ésta recupere el estado de inactividad.

La mayoría de las mutaciones en CPNM se dan en el gen K-ras. Se trata de mutaciones activadoras del gen, que se producen en los codones 12, 21 o 61, codificantes de zonas cercanas o del propio dominio de unión del GTP. Son predominantes en el adenocarcinoma y se presentan fundamentalmente en pacientes fumadores (45). El valor pronóstico de las mutaciones en este gen aún no está claro. Por una parte, estudios realizados sobre especímenes quirúrgicos de pacientes operados, relacionan la presencia de mutación en K-ras y los niveles de expresión de p21 determinados por inmunohistoquímica con una menor supervivencia (46). Sin embargo, otros estudios no han conseguido evidenciar esta relación pronóstica (47) (48). Con respecto a la implicación terapéutica de este marcador, se ha sugerido que las mutaciones en K-ras podrían suponer un biomarcador negativo de respuesta a terapias anti-EGFR, aunque los estudios realizados no demuestran claramente esta asociación (49).

6.1.3. *EGFR*:

La vía de señalización mediada por EGFR es una de las vías clásicamente implicadas en la oncogénesis de varios tipos de tumores, entre ellos el CP. La sobreexpresión de EGFR se ha asociado con enfermedad avanzada y peor pronóstico en algunos estudios donde se realizaba un análisis de expresión combinado para varios factores oncogénicos (50, 51). Sin embargo, estos resultados no se reproducen cuando se realiza un análisis exclusivo para EGFR tanto genético como de expresión proteica (52) (53). Por otra parte, las mutaciones activadoras en el dominio tirosínkinasa del receptor provocan activación constitutiva de la vía, siendo ésta la base del desarrollo de los inhibidores tirosínkinasa de EGFR como alternativa terapéutica en CP. Ciertas mutaciones de EGFR podrían comportarse como predictoras de respuesta a estas terapias (54) .

6.1.4. *HER2*:

El receptor HER2, de la familia de receptores de EGFR, también está implicado en la carcinogénesis pulmonar. La sobreexpresión del gen se ha relacionado con un peor pronóstico y disminución de la supervivencia, al igual que el aumento en los niveles séricos de HER2 previos al tratamiento (55) (56), pero no todos los estudios son concluyentes a este respecto (57). Por otra parte, las mutaciones en el dominio tirosínkinasa de HER2 se producen en un pequeño porcentaje de pacientes, siendo más frecuentes en mujeres, adenocarcinomas y en pacientes nunca fumadores (58). La implicación pronóstica de las mutaciones en HER2 tampoco es clara, en base a varios estudios recientes donde no se demuestra correlación de las mismas con la supervivencia (59). Además, en contraste con las nuevas terapias anti-EGFR, el abordaje terapéutico basado en el bloqueo del receptor HER2 mediante pequeñas moléculas no ha obtenido hasta la fecha resultados satisfactorios, aunque para una evaluación más precisa de la eficacia de estos agentes, sería oportuno seleccionar a los pacientes candidatos a tratamiento de acuerdo a criterios moleculares, esencialmente la presencia de mutación o amplificación de HER2 (60).

6.1.5. *Met y HGF*:

El protooncogén c-met codifica para un receptor de membrana, Met, cuyo ligando es el factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF). La señalización mediada por Met y HGF participa en procesos de proliferación celular, pero también regula procesos de motilidad celular e invasión de la matriz extracelular. (61). La desregulación de la vía Met/HGF, tanto por sobreexpresión o mutaciones de Met, como por el aumento en los niveles de HGF, se ha relacionado con un peor pronóstico en CP (62). También se ha implicado a esta vía en la adquisición de resistencia al tratamiento con inhibidores tirosínkinasa de EGFR, mediante la amplificación del oncogén c-met (63) o mediante la sobreproducción de HGF. Se ha observado una correlación directa entre los niveles plasmáticos de HGF y la resistencia intrínseca o adquirida a esas terapias con su correspondiente correlato clínico (repuesta, estabilización o progresión de la enfermedad), postulándose el papel del HGF en plasma como biomarcador de respuesta/resistencia a este tratamiento (64). En contraste a lo anteriormente expuesto, es interesante la observación realizada sobre muestras tumorales de CP, en las que la expresión de Met y los niveles de HGF son mucho más altos en el tumor propiamente dicho en comparación con zonas de tejido normal adyacentes al tumor (65). Este hallazgo sería concordante con la hipótesis de que HGF se produce por las células mesenquimales imbuidas en el tumor y actúa de forma paracrina sobre el receptor Met que presentan las células tumorales (66).

6.1.6. *Bcl-2*:

Este gen codifica para la proteína Bcl-2, con actividad antiapoptótica. Su valor pronóstico no se ha esclarecido actualmente, dados los resultados contradictorios de los estudios realizados hasta la fecha. Un metaanálisis sobre varios estudios otorga a la sobreexpresión de este gen un valor pronóstico positivo en CPNM resecado (67), así como un estudio reciente en pacientes con tumores localmente avanzados tratados con quimiorradioterapia concurrente (68).

6.2. Genes supresores de tumores:

Los genes supresores tumorales son genes que en condiciones normales controlan el ciclo celular, deteniendo la progresión en el mismo en respuesta a un daño en el ADN o a señales extracelulares. Cuando estos genes sufren mutaciones que los inactivan, el resultado es una proliferación celular anormal que puede dar origen a tumor maligno.

6.2.1. *p53*:

El gen *p53* codifica para un factor de transcripción nuclear que participa en la regulación del ciclo celular, bloqueando la progresión de la célula en la fase G1 del mismo. Es esencial en la respuesta al daño en el ADN producido por radiaciones ionizantes u otros carcinógenos. La pérdida de función de este gen provoca que las células sean capaces de proliferar a pesar de presentar alteraciones en su ADN. Por ello, este gen ha sido descrito como “guardián del genoma” y es considerado un gen supresor tumoral (69).

Las mutaciones en *p53* se han asociado con mucha frecuencia al desarrollo de CP, de hecho, este gen se encuentra mutado en alrededor del 50% de los tumores pulmonares, y en casi la totalidad de los tumores pulmonares con histología escamosa (70). Sin embargo, su valor pronóstico es desconocido. Dos metaanálisis han concluido que las mutaciones o la sobreexpresión de este gen podrían asociarse con una disminución en la supervivencia, aunque con particularidades, ya que en uno de ellos el impacto se describía en todos los subtipos de CPNM y en el otro exclusivamente para el subtipo adenocarcinoma (71, 72). La dificultad para hallar una relación consistente entre *p53* y pronóstico estiba en la heterogeneidad metodológica de los estudios realizados, tanto en lo referente a las características clínicas de los pacientes, como a la detección de anomalías en el estatus de *p53*, ya sea por análisis de expresión (detección por inmunohistoquímica de proteína *p53* no funcionante), por detección de mutaciones en el gen (estudio mutacional incompleto), o por la combinación de ambos procesos, ya que distintas mutaciones en el gen pueden producir diferencias en la expresión y en la función de la proteína resultante (73). Por otra parte, *p53* es el eslabón final de numerosas vías de señalización implicadas en la carcinogénesis pulmonar, y por lo tanto, su expresión y función puede verse

modificada por las alteraciones en genes y proteínas previas en esas cascadas de señalización. Los últimos estudios sobre el valor pronóstico de p53 se centran en la relación de p53 con dichas vías, tales como la neoangiogénesis tumoral (74) , la transición epitelio-mesénquima (75), los procesos de apoptosis (76), o la detección del daño celular y la respuesta a estrés (77).

6.2.2. *Rb*:

El gen *Rb* codifica para una proteína nuclear, que, al igual que p53, está implicada en la regulación del ciclo celular en la fase G0/G1. Su actividad depende de su estatus de fosforilación: al final de la mitosis, *Rb* se desfosforila impidiendo la progresión del ciclo desde la fase G1 a S. Al final de G1, las quinasas dependientes de ciclina fosforilan a *Rb* inactivándola, de modo que la célula es capaz de progresar en el ciclo.

La delección del gen *Rb* se ha descrito en más del 90% de los carcinomas microcíticos de pulmón, sin embargo este hallazgo es poco frecuente (alrededor de un 15%) en CPNM. La pérdida de esta proteína se ha asociado con peor pronóstico y menor supervivencia (78). Además, la coexistencia de esta alteración genética con otras, como alteraciones en p53, conlleva un empeoramiento adicional del pronóstico (79). La pérdida de *Rb*, por otra parte, parece incrementar la sensibilidad a quimioterapia, tal y como se ha observado en líneas celulares y modelos animales de CPNM (80) .

6.2.3. *p16INK4A* y *p16INK4B*:

Ambos genes codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular en el punto de control G1 del ciclo, cuya acción está muy ligada a la de la proteína *Rb*. Estas proteínas inhiben a la quinsa dependiente de ciclina CDK4, impidiendo el paso de la fase G1 a S del ciclo. La pérdida de función de *p16INK4A*, ya sea por mutación puntual, delección o metilación aberrante del promotor, permite que estas quinasas fosforilen a *Rb* de forma constitutiva, inactivando el punto de control G1/S y permitiendo la entrada descontrolada de la célula en la fase S del ciclo. Estos genes han sido propuestos como genes supresores tumorales en tumores con *Rb* nativo(81).

Se ha observado que los tumores no microcíticos de pulmón con expresión de Rb presentan escasa o nula proteína p16, mientras que aquellos negativos para Rb presentan abundantes niveles de p16 (82). El papel pronóstico de p16 tampoco ha sido esclarecido. Algunos estudios asocian la pérdida de p16 con una menor supervivencia en carcinoma escamoso (83) (84), mientras que otros estudios no han logrado evidenciar esta asociación(85).

6.3. Genes de reparación del ADN:

6.3.1. ERCC1 Y RRM1:

Ambos genes forman parte del sistema de reparación de roturas de doble cadena del ADN. Este sistema y su relación con la respuesta a derivados del platino serán tratados en profundidad más adelante. Los datos relativos a su valor pronóstico son controvertidos. En pacientes resecaados en estadios tempranos, los altos niveles de expresión de RRM1 y ERCC1 se correlacionan con un mejor pronóstico (86). Sin embargo, en pacientes con tumores avanzados la expresión de ambos genes se relaciona con una menor supervivencia (87).

6.4. Genes de invasión tumoral y metástasis:

La capacidad metastásica es el atributo más letal de un tumor. La diseminación temprana y la formación de micrometástasis, incluso antes de ser detectable el tumor primario, es una característica frecuente e intrínseca del CP (88). Para que suceda este proceso, es necesaria una compleja interacción entre las células tumorales y la matriz extracelular (MEC), compuesta por la membrana basal y otras grandes moléculas sobre las que asienta (colágeno tipo IV, laminina y proteoglicanos de heparán-sulfato). La degradación de la MEC, fundamentalmente del colágeno tipo IV, es un proceso dinámico y dependiente de la producción tanto de los distintos elementos de la MEC, como de la activación de los elementos reguladores de la misma, como proteinasas e inhibidores de proteinasas. Las dos familias de proteinasas más importantes son la del factor activador del plasminógeno (PA) y la de las metaloproteinases de la matriz (MMP).

6.4.1. *Factor activador del plasminógeno:*

El plasminógeno, proenzima de la plasmina, es activado mediante los activadores del plasminógeno (tisular t-PA, o tipo urokinasa, u-PA). La plasmina puede degradar la fibronectina, la laminina, la fibrina el colágeno tipo IV por proteólisis. Por otra parte, existen inhibidores de PA, como los inhibidores del plasminógeno 1 y 2 (PAI-1, PAI-2), las nexinas-proteasa, y la alfa-2-antiplasmina. Es necesario un adecuado balance entre todos estos componentes para mantener la homeostasis de la MEC. Sin embargo, durante el crecimiento tumoral, ese balance se rompe, dando como resultado la formación de metástasis. En CPNM, la sobreexpresión de PA por las células tumorales superaría el efecto de sus inhibidores, permitiendo la diseminación metastásica (89). Además, los distintos niveles de expresión de activadores e inhibidores de PA por las células tumorales ocasiona que éstas muestren un distinto potencial metastásico (90). Las alteraciones en este sistema podrían tener valor pronóstico, como se ha observado en un estudio en el que la sobreexpresión de uPA se correlacionaba con una menor supervivencia(91), al igual que la detección en sangre del receptor de PA o sus fragmentos (92), aunque esto no se ha confirmado en otros estudios(89) .

6.4.2. *Metaloproteinasas de la matriz (MMPs):*

Estas enzimas son liberadas a la MEC en forma inactiva (proenzimas) y se activan al entrar en contacto con el microambiente de la MEC. Se han descrito 11 subtipos distintos, de acuerdo al sustrato sobre el que actúan: colagenasa, estromelisin y gelatinasas (colagenasas tipo IV). Algunas están implicadas en el recambio de los componentes de la MEC y en la invasión tumoral, especialmente la MMP1 (colagenasa tipo 1). La actividad de estas enzimas también está estrechamente regulada por inhibidores, tanto séricos, como la alfa-2-macroglobulina, como tisulares (inhibidores tisulares de metaloproteinasas, TIMPs).

En CPNM se ha observado que algunas metaloproteinasas como MMP1, MMP2 y MMP9, así como los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2, están sobreexpresados (93). Dicha sobreexpresión podría asociarse a un peor pronóstico para pacientes con tumores en estadios tempranos (94) (95). Sin embargo, la correlación pronóstica para TIMP-3 es inversa, ya que son los bajos niveles de expresión de TIMP-3 en pacientes

con CPNM reseca los que se correlacionan con un estadio mayor, una mayor aparición de afectación ganglionar y una peor supervivencia (96). También se ha explorado si la variación de los niveles plasmáticos de algunas de estas proteínas podría tener un valor pronóstico. Así, los bajos niveles de MMP en plasma se han relacionado con una mayor tasa de supervivencia al año (97). La expresión de las MMPs puede ser regulada por otros factores, tales como EGFR o el factor nuclear kappa B, lo que añade complejidad a la regulación de este sistema y su relación con el pronóstico de la enfermedad.

6.4.3. *Genes de la transición epitelio-mesénquima:*

Otro de los procesos implicados en la generación de metástasis es la llamada transición epitelio-mesénquima, la cual consiste en la pérdida del fenotipo epitelial celular, mediante la disminución de las uniones intercelulares, para adquirir capacidades propias de las células mesenquimales, como una mayor motilidad celular. Este proceso se logra mediante la disminución / supresión de las proteínas de adhesión como e-cadherina, y el aumento de proteínas como la vimentina. La transición epitelio-mesénquima, presente característicamente en el desarrollo embrionario, se manifiesta en la célula tumoral debido a la alteración en los factores que regulan y suprimen este proceso en la célula no neoplásica (98). Los factores Snail, TWIST1 y HIF1 α , implicados en la transición epitelio-mesénquima, se sobreexpresan en CPNM, y su sobreexpresión se correlaciona con un peor pronóstico(99).

6.5. Angiogénesis e inflamación:

El proceso de neoangiogénesis, es decir, la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos, es un fenómeno tardío en el desarrollo de un tumor y está estrechamente ligado a la proliferación tumoral y al desarrollo de metástasis. Existe toda una red de complejas interacciones que regulan la angiogénesis tumoral, y que implican la secreción de un gran número de factores de señalización por parte de las células tumorales y de las células estromales e inflamatorias circundantes, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGF), interleukinas 8 y 12, angiogenina y angiotropina, factor transformante del crecimiento beta, factor tumoral de necrosis alfa, sintasa de óxido nítrico y ciclooxigenasa 2 (100). Por ello, la

neoangiogénesis tumoral y los fenómenos inflamatorios que acompañan al desarrollo del tumor, junto con la regulación de la respuesta inmune del huésped son campos de investigación emergente en los últimos años, tanto por su valor pronóstico como por las implicaciones terapéuticas que ofrecen. El aumento de la neoangiogénesis tumoral podría representar un factor pronóstico adverso en pacientes con CPNM resecado(101)(102), aunque esta hipótesis no ha sido confirmada en todos los estudios realizados(103). Se ha descrito que los bajos niveles de expresión de VEGF-A y VEGFR-2, junto con una alta tasa de infiltración linfocitaria, representan un factor pronóstico favorable en CPNM(104).

7. MECANISMOS MOLECULARES DE RESPUESTA Y RESISTENCIA A DERIVADOS DEL PLATINO EN CANCER DE PULMÓN:

Los dos derivados del platino usados en CP son el cisplatino y el carboplatino. Ambos fármacos constan de un grupo platino principal en su estructura química, que constituye el elemento fundamental para su actividad citotóxica. Los derivados del platino producen la muerte celular mediante la formación de aductos o puentes covalentes intracatenarios (90%) e intercatenarios (<2%) en el ADN celular. El 60% de los enlaces se localizan en la posición N7 de la guanina y el 30% en la posición N7 de la adenina. El grado de daño al ADN se relaciona con el grado de muerte celular. También se unen de forma covalente a otros componentes celulares como proteínas, lípidos, ARN y ADN mitocondrial, produciendo alteración del transporte transmembrana de aminoácidos esenciales, alteración de los canales de calcio, la respiración mitocondrial y el transporte de fosfatos, todos ellos considerados mecanismos secundarios de citotoxicidad mediada por estos compuestos.

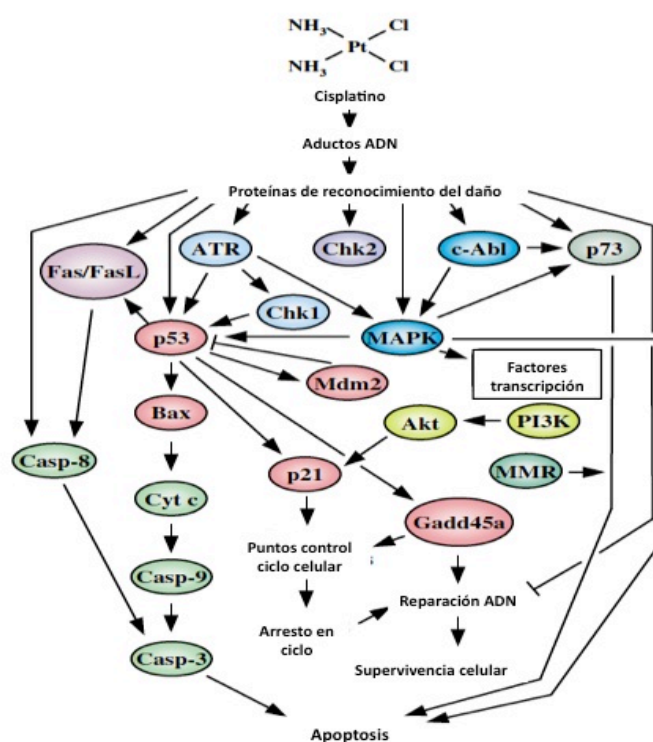


Figura 1: Mecanismos celulares mediadores de la respuesta a platino (tomado de (105)).

A nivel subcelular se han descrito varios mecanismos posibles por los que la célula puede ser sensible o resistente a los compuestos derivados del platino. Dado que el daño celular principal de estos fármacos se produce mediante su acción sobre el ADN, podemos dividir esos mecanismos de sensibilidad/resistencia en tres categorías: aquellos que actúan antes de producirse el daño al ADN (disminución de la captación celular del fármaco, aumento de la excreción celular del fármaco, y detoxificación intracelular), aquellos que se relacionan directamente con el daño al ADN (disminución de la unión del fármaco al ADN, alteración de la reparación del ADN o aumento de la tolerancia al daño en el ADN), y por último, aquellos que ocurren posteriormente al daño en el ADN (disminución o inhibición de la apoptosis, aumento de las chaperonas, alteración de la señalización celular y alteración de la regulación del ciclo celular) (37).

En el contexto expuesto, se han descrito más de 60 genes específicos con expresión diferencial entre células y tumores sensibles y resistentes a platino, aunque ninguno de ellos hasta la fecha se ha establecido como biomarcador predictivo fiable de respuesta o resistencia a estos compuestos. La vía más estudiada es la que concierne a los sistemas de reparación del ADN, concretamente la del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide excision repair, NER), en el que se encuentra implicada la proteína ERCC1, ampliamente estudiada como factor predictivo de respuesta a quimioterapia basada en platino en CP (figuras 1 y 2).

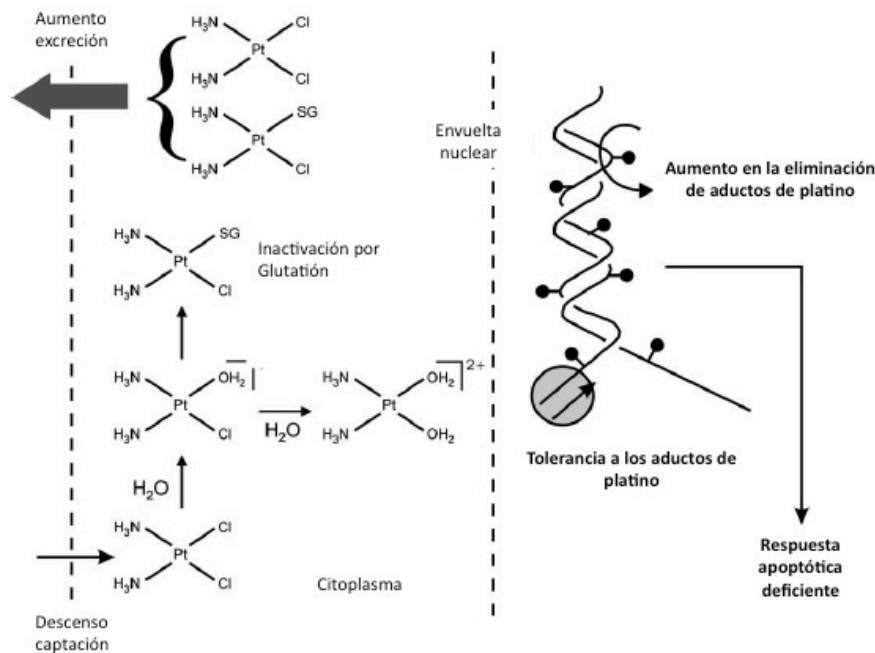


Figura 2: Mecanismos de resistencia a platino (modificado de (106))

7.1. Captación y excreción celular de platino:

Un mecanismo importante de la resistencia a platino es la disminución de su concentración efectiva en la célula. Esto puede deberse tanto a una disminución en la captación del fármaco como a un aumento en la excreción del mismo.

La captación de cisplatino y carboplatino se realiza de forma pasiva por la célula, aunque el potencial de membrana y el pH extracelular pueden alterarla. Los transportadores de cobre Ctr1, ATP7A y ATP7B también modifican la captación de platino. El primero influye sobre la captación, de modo que la disminución en su expresión se relaciona con una menor captación de cisplatino y carboplatino y una mayor resistencia a estos compuestos en líneas celulares de cáncer microcítico de pulmón (107). Con respecto a la excreción, las proteínas de resistencia múltiple a drogas (*multidrug resistant proteins*, MRP) actúan como bombas de excreción dependientes de ATP para varios compuestos entre los que se incluye el cisplatino, siendo causantes de resistencia al mismo. Este hecho se ha observado en líneas celulares hepatocitarias y de cáncer de ovario. Sin embargo, la expresión inmunohistoquímica de MRP1 y MRP2 en muestras tumorales de pacientes operados por CPNM, no constituyó un factor predictivo de respuesta a tratamiento adyuvante basado en platino (108).

7.2. Detoxificación intracelular: Glutación, metalotioneínas y antioxidantes:

La inactivación citosólica de los derivados de platino, que ocurre cuando la célula tumoral alcanza un alto grado de resistencia a estos compuestos, está mediada, entre otros, por el incremento del glutatión y las metalotioneínas. El glutatión actúa por sí mismo como un antioxidante celular, manteniendo el equilibrio redox. El cisplatino es conjugado con glutatión mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST), impidiendo así la unión del fármaco al ADN y su acción citotóxica (109). Los niveles elevados tanto de glutatión como de glutatión-S-transferasa parecen estar relacionados con la resistencia a cisplatino en CPNM. Un estudio japonés en el que se realizó tinción inmunohistoquímica de la enzima glutatión-s-transferasa pi en 38 pacientes con CPNM avanzado, encontró que en pacientes con tinción negativa la TR a tratamiento con platino era del 66%, mientras que en los pacientes con tinción positiva la TR fue del 12% (110). Sin embargo, otros estudios no han confirmado esta relación (111) por lo que el valor clínico de estos hallazgos sigue siendo controvertido. Por otra parte, parece que los polimorfismos en varios elementos de esta vía también podrían influir en la respuesta a platino. Un estudio sobre 973 muestras de pacientes con CP, encontró una asociación entre la SG y el número de copias de GST-T1, así como con determinados SNPs en GSTA5, GSTM4 y ABCC4. Posteriormente

realizaron un estudio funcional sobre líneas celulares, donde se observó que la sobreexpresión de GST-M4 y GST-T1 se asociaban con resistencia a cisplatino (112) .

Otras proteínas implicadas en este contexto son las metalotioneínas y la tiorredoxina, que participan, al igual que el glutatión, en la regulación del equilibrio redox celular. Las metalotioneínas están además involucradas en el control de los niveles de cobre y zinc. Estas proteínas también pueden unirse a cisplatino, inactivándolo. Los niveles elevados de estos factores se relacionan con el desarrollo de resistencia a cisplatino en líneas celulares de CPM (113) aunque por el momento no existen datos concluyentes en el ámbito clínico.

La enzima dihidrodiol deshidrogenasa (DDH) pertenece a una superfamilia de oxirreductasas dependientes de NADPH presentes en el citosol que catalizan la oxidación y reducción de varios xenobióticos. Los niveles elevados de expresión de esta enzima se han asociado a un peor pronóstico en pacientes con CPNM (114). El análisis de expresión de DDH (total y por isoformas) mediante **western blot** sobre 6 líneas celulares de CP (4 epiteliales, una de tipo neuroendocrino y otra de mesotelioma), mostró una asociación entre los niveles bajos de DDH y la sensibilidad a platino en las líneas celulares de origen epitelial. Cuando se escogió la línea celular epitelial más resistente a platino y se realizó un silenciamiento de la expresión de las isoformas DDH1 y DDH2 mediante ARN interferente, se observó un marcado incremento en la sensibilidad a platino, en especial en aquellas células con mayores niveles de silenciamiento de DDH1(115). El mecanismo por el cual DDH modula la sensibilidad o resistencia a platino parece implicar a diversos mediadores proinflamatorios, como interleukina 6, que inducirían la expresión de la aldo-ceto-reductasa AKR1C1/1C2, incrementando la resistencia a platino, como se ha podido comprobar en líneas celulares de CPNM (116).

7.3. Reparación del daño al ADN. Sistemas de reparación del ADN:

La reparación de los aductos generados por platino tiene lugar principalmente a través de los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*, NER), y de corrección de errores en el emparejamiento de bases (*Mismatch Repair*, MMR) (figura 3).

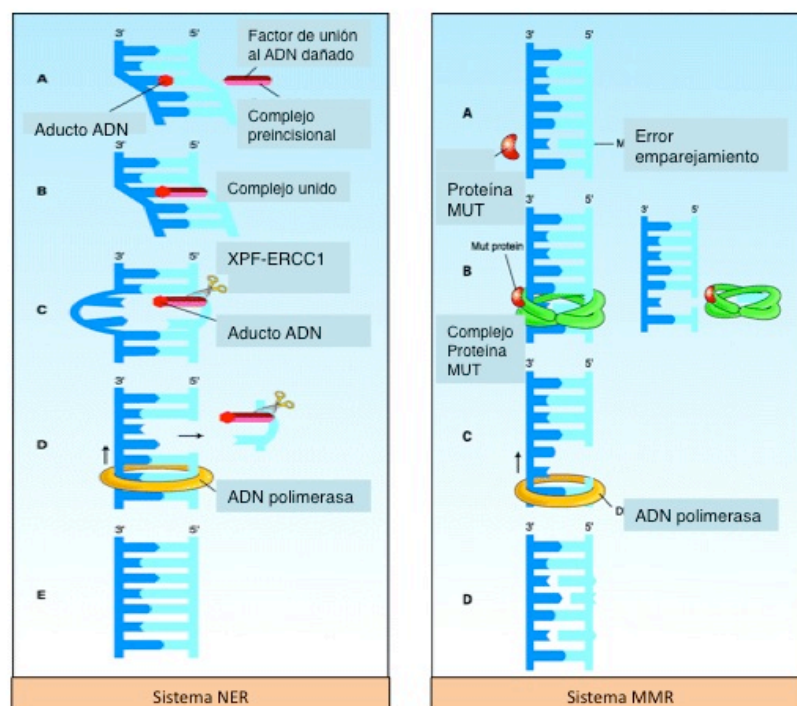


Figura 3: sistemas de reparación del ADN principales en la reparación del daño por cisplatino (modificado de (117))

7.3.1. Sistema NER. ERCC1:

El sistema NER es un sistema de reparación altamente conservado que repara alteraciones en el ADN que producen un cambio en su estructura helicoidal e impiden la replicación y la transcripción. En primer lugar, se reconoce el área dañada y se demarca a ambos lados de la lesión, posteriormente se forma un complejo proteico para desenrollar la hélice en ese punto, escindir el área dañada, sintetizarla nuevamente y ligarla a los puntos de corte. Este sistema está constituido por más de 36 genes, pero hay 16 que son cruciales para el reconocimiento y la escisión del DNA, entre los que se encuentran ERCC1, XPA, XPB, XPD, XPF y CSB. La proteína ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*) tiene un papel principal en este sistema. ERCC1 dimeriza con la proteína XPF (*xeroderma pigmentosum complementation group F*) formando un complejo necesario para la escisión 5' con

respecto a la zona dañada del ADN. Este proceso es el paso limitante para la velocidad de reparación de este sistema (118). Además, este complejo interviene en la reparación por recombinación homóloga de los puentes intercatenarios, que, si bien se forman con mucha menor frecuencia, también constituyen uno de los modos de actuación de los compuestos de platino (119).

La relación entre la expresión de ERCC1 y la sensibilidad o resistencia a platinos se ha explorado en diversos tumores como el cáncer de ovario (120), el cáncer colorrectal (121), el cáncer gástrico (122) o el CP (123). Aunque la implicación de ERCC1 en la resistencia a estos compuestos resulta plausible desde el punto de vista biológico, aún no se ha establecido de forma precisa el valor de ERCC1 como biomarcador pronóstico o predictivo de respuesta a platino en CPNM, a pesar de los numerosos estudios realizados en este contexto. En el entorno de la enfermedad temprana, los niveles elevados de ERCC1 en el seno tumoral parecen correlacionarse con un incremento de la supervivencia en pacientes que no reciben quimioterapia posterior. Sin embargo, en aquellos pacientes que la reciben, los niveles altos de ERCC1 se correlacionarían con una peor supervivencia, lo que traduciría el efecto deletéreo de un sistema reparador competente sobre el efecto de la quimioterapia (86)(124). Sin embargo, los estudios publicados en CPNM avanzado no alcanzan resultados uniformes a este respecto, hecho que adquiere mayor importancia bajo la perspectiva de que los compuestos derivados de platino constituyen la primera línea de tratamiento en estos pacientes. Mientras que en algunos estudios se objetiva el valor pronóstico favorable de los niveles bajos de expresión de ERCC1 (87)(125), otros estudios no logran evidenciar una relación entre los niveles de ERCC1 y la respuesta a quimioterapia o el pronóstico (126)(127). Tampoco los ensayos clínicos que han utilizado la expresión de ERCC1 como factor de decisión para la elección del tratamiento quimioterápico han mostrado un efecto diferencial de la elección basada en ERCC1 en el pronóstico de los pacientes (128).

El valor de determinados polimorfismos de ERCC1 en el pronóstico y la respuesta a platino también ha sido analizado, los más estudiados son los polimorfismos C118T y C8092A. En un metaanálisis de los estudios publicados no se ha logrado evidenciar la relación entre estos polimorfismos y la respuesta a quimioterapia basada en platino, la supervivencia libre de progresión o la

supervivencia global en CPNM (129). Como puede extraerse de todos estos datos, son necesarias evidencias adicionales que permitan clarificar el valor de la expresión de ERCC1 en predicción pronóstica y de respuesta a tratamiento.

7.3.2. Sistema MMR:

El sistema de reparación de errores de emparejamiento (*Mismatch Repair system*, MMR) es un sistema de reparación altamente conservado, específico de cadena, que se inicia con el reconocimiento de las bases mal apareadas o no apareadas, así como de los bucles de inserción/delección. Este reconocimiento es mediado por las proteínas MMR (llamadas proteínas Mut). Tras este reconocimiento, una serie de proteínas aún no bien conocidas escinden el área afectada, que es sintetizada de nuevo por la ADN polimerasa. El funcionamiento deficiente de este sistema de reparación origina un acúmulo de áreas no reparadas de ADN, generándose inestabilidad de microsatélites con las sucesivas replicaciones celulares (130). Este sistema también es necesario para la citotoxicidad mediada por cisplatino y carboplatino: El sistema MMR detecta los daños en el DNA producidos por estos compuestos pero no los repara, sino que dirige a la célula con dichos daños hacia la apoptosis. Cuando el sistema MMR es deficiente, la célula puede seguir proliferando a pesar del daño causado por estos fármacos, y, por lo tanto, se vuelve resistente a los mismos. Los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6 parecen ser cruciales en el mantenimiento de la integridad del sistema (131).

La relevancia de este sistema de reparación en el tratamiento con platino se ha estudiado fundamentalmente en cáncer colorrectal y ovárico. No obstante, un análisis retrospectivo en 93 pacientes con CPNM avanzado tratados con gemcitabina y cisplatino u oxaliplatino, observó una diferencia significativa en la TR a uno u otro tratamiento en pacientes con deficiencia de hMSH2: la TR fue del 38% en pacientes tratados con oxaliplatino, mientras que fue del 0% en pacientes tratados con cisplatino (132).

7.3.3. Otros sistemas de reparación. BRCA1:

La proteína BRCA1 (*Breast Cancer 1*) está implicada en el sistema NER de reparación del ADN, concretamente en la reparación acoplada a la transcripción

(*Transcription coupled nucleotide excision repair*, TC-NER), que repara las alteraciones en el ADN de las cadenas transcritas de los genes expresados (por oposición a la reparación del genoma global, GG-NER, que repara las cadenas no transcritas de los genes expresados y también las regiones no expresadas del genoma). La importancia del sistema NER en la reparación del daño inducido por platino ya ha sido revisada previamente. Además, participa en los procesos de reparación por recombinación homóloga y por recombinación de extremos no homólogos, importantes en la reparación de las roturas de doble cadena generadas a consecuencia de la formación de puentes intercatenarios. Por último, también forma parte de un gran complejo de reparación del ADN, denominado complejo de vigilancia genómica asociado a BRCA-1 (*BRCA1-associated genome surveillance complex*, BASC), del que forman parte varias proteínas MMR (133). BRCA1 también ejerce un papel regulador sobre el ensamblaje del huso mitótico (134), sobre el control del ciclo celular(135), y también toma parte en la apoptosis vía kinasa c-Jun (136).

Varios modelos preclínicos en líneas celulares de diversos tumores sugieren que este gen confiere sensibilidad a los agentes antimicrotúbulos (paclitaxel y vincristina), pero induce resistencia a los agentes anti ADN (cisplatino y etopósido) y a la radioterapia (137). Taron y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo sobre 55 especímenes quirúrgicos de pacientes con CPNM tratados con quimioterapia neoadyuvante, y estratificaron a los pacientes en 4 cuartiles dependiendo del nivel de expresión de BRCA1. Los niveles bajos o intermedios de ARNm de BRCA1 se correlacionaban con una mayor supervivencia tras tratamiento con platino, mientras que los pacientes con alta expresión de BRCA1 presentaban pobres supervivencias. Así, la supervivencia mediana no fue alcanzada en los 15 pacientes en el cuartil de expresión más bajo, fue de 37,2 meses para los 28 pacientes en los dos cuartiles intermedios, y fue de 12,7 meses en los 12 pacientes del cuartil superior (138). Posteriormente, este mismo grupo planteó un estudio fase II en 123 pacientes con CPNM avanzado en los que el tratamiento quimioterápico se elegía en función de la presencia de mutaciones en EGFR y de los niveles de expresión de BRCA1: aquellos pacientes con mutación en EGFR recibían erlotinib como tratamiento de primera línea, mientras que en aquellos pacientes sin mutación se analizaban los niveles de expresión de BRCA1. Los pacientes con niveles bajos recibían cisplatino y gemcitabina, los pacientes con niveles intermedios, cisplatino y docetaxel, y los

pacientes con niveles altos, docetaxel en monoterapia. La supervivencia mediana fue de 11 meses en pacientes con expresión de BRCA1 baja, con una supervivencia a dos años del 41,2%, mejorando los datos disponibles con respecto al tratamiento estándar con cisplatino-gemcitabina o cisplatino-pemetrexed (10,3 meses y 22%). En este estudio, también se exploró el papel de la proteína RAP80, moduladora de la actividad de BRCA1, en la respuesta obtenida, sugiriéndose que altos niveles de RAP80 podrían ocasionar resistencia a cisplatino aún en presencia de niveles bajos de BRCA1 (139).

Otra enzima implicada en la reparación del ADN es la enzima APE1 (*apurinic/apirimidinic endonuclease*), una proteína multifuncional clave en el sistema de reparación del ADN por escisión de bases (*Base-excision repair*, BER). Esta proteína también interviene en la modulación transcripcional frente a estrés oxidativo, reduciendo y activando otros factores como AP1, HIF-1 α , p53 y otros factores que controlan el crecimiento y la supervivencia celular. La relación entre esta enzima y la respuesta / resistencia a platino en CP se ha puesto de manifiesto en un estudio donde se evaluaron los niveles de APE1 por inmunohistoquímica y *western blot* en muestras tumorales de 103 pacientes operados por CPNM. Se encontró sobreexpresión en el 83,3% de los casos resistentes a platino mientras que en los casos sensibles sólo se detectó en el 8,3%. El tratamiento con platino sobre la línea celular A549 resultó en un incremento dosis dependiente de los niveles de esta enzima, y la inhibición de su expresión mediante ARN interferente aumentaba la apoptosis y la sensibilidad a platino en estas células (140).

7.3.4. Sistema de síntesis translesional:

El sistema de síntesis translesional es un sistema por el cual la célula se hace tolerante al daño en el ADN producido por cisplatino y no reparado por los sistemas de reparación correspondientes. Este sistema está compuesto por un conjunto de ADN polimerasas capaces de sintetizar ADN eludiendo las lesiones no reparadas. En mamíferos, estas polimerasas son Pol η (POLH), Pol ι (POLI), Pol κ (POLK) y Pol ξ (con dos subunidades, REV3 y REV7), específicas de sustrato. Estas enzimas se combinan de formas diferentes dependiendo del tipo de daño producido en el ADN (141).

La importancia de este sistema en la tolerancia celular a cisplatino ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios *in vitro*. Concretamente, la deficiencia de Pol η provoca una mayor sensibilidad a cisplatino en distintas líneas celulares tumorales (142). En un estudio sobre 72 pacientes con CPNM avanzado tratados con platino, los niveles elevados de ARNm de Pol η se correlacionaban de forma inversa con la supervivencia (HR de 3.18; 95% CI, 1.73-5.84; $P = 0.008$). Este estudio también demostraba que el tratamiento con platino podía inducir la expresión de Pol η en líneas celulares de CPNM, y que los niveles de Pol η se correlacionaban con la sensibilidad o resistencia a cisplatino *in vitro* (143). Por otra parte, la supresión de REV3, la subunidad catalítica de Pol ξ , resulta en una mayor sensibilidad a cisplatino en modelos *in vivo* de CP(144).

7.4. Apoptosis y ciclo celular:

Los mecanismos de apoptosis y las proteínas implicadas en ellos también tienen un papel preponderante en el desarrollo de resistencia a los compuestos de platino en CP. La apoptosis, o muerte celular programada, puede desencadenarse por dos vías diferentes, ambas confluentes en una vía común efectora en la que participan las caspasas 3, 6 y 7. La vía extrínseca mediada por receptor es activada mediante la unión de ligandos extracelulares a los receptores de la superfamilia TNF, que incluye a los receptores TNF1, Fas, DR3, DR4 (TRAILR1), DR5 (TRAILR2) y DR6). Estos receptores están acoplados a proteínas intracitoplasmáticas que poseen dominios de muerte (*Fas-associated protein with death domain*, FADD) y a varias proteínas adaptadoras. El reclutamiento de varias proteasas mediante estas proteínas intracelulares da lugar a la formación del complejo señalizador para la inducción de muerte (*death-inducing signalling complex*, DISC), que media la activación de la caspasa 8. La vía intrínseca o mitocondrial, sin embargo, se activa frente a estímulos de estrés celular, como el daño en el ADN inducido por citotóxicos o radiación entre otros. Esta vía se inicia con la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria, como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF) o la proteína Smac. Así, los factores proapoptóticos de la familia de Bcl-2, Bax y Bak, aumentan la permeabilidad mitocondrial e inducen la liberación del citocromo c mediante la oligomerización e inserción en la membrana mitocondrial externa. AIF se transloca al núcleo donde interviene en la condensación de la cromatina y en la fragmentación del

ADN. Por otra parte, el citocromo c se une a la proteína adaptadora Apaf-1 y forma el apoptosoma, al cual se une la caspasa 9, activándose su actividad proteolítica. Este complejo es capaz de activar a las caspasas efectoras 7 y 3, que intervienen en la liberación de la poli-ADP-Ribosa polimerasa (PARP) y en la fragmentación del ADN.

Por otra parte, el ciclo celular y sus reguladores están estrechamente relacionados con la apoptosis y también se han relacionado con la resistencia celular a compuestos de platino. Algunas de las proteínas clave, como p53 o p21, implicadas en la detección de daño en el DNA en los puntos de control del ciclo, detectan el daño producido por estos compuestos y podrían desempeñar un papel destacado en el desarrollo de resistencia a los mismos.

7.4.1. p53:

El gen supresor p53, además de regular el ciclo celular, bloquea la progresión de la célula en el ciclo celular y desencadena la apoptosis en respuesta al daño en el ADN producido por citotóxicos, entre otros. En un estudio realizado en pacientes operados que participaron en el ensayo JBR.10 sobre tratamiento adyuvante, la sobreexpresión de p53, medida por inmunohistoquímica sobre muestras parafinadas, se asociaba a un mayor beneficio de la quimioterapia en estos pacientes (HR 0,54 CI 95% 0,32-0,92 para los que sobreexpresaban p53, vs HR 1,4 CI 0,58-2,52 para aquellos con expresión normal)(145). El aumento intracelular de esta proteína también se ha relacionado con una mayor respuesta a cisplatino y paclitaxel en líneas celulares de CPNM (146), aunque no todos los estudios realizados son concordantes con estas observaciones. De hecho, en un estudio realizado sobre pacientes con CPNM avanzado, se identificó la positividad inmunohistoquímica de esta proteína como un factor predictivo independiente de resistencia a quimioterapia basada en platino (147). Un estudio reciente ha puesto de manifiesto la relación entre los polimorfismos de este gen y la respuesta a platino en CPNM avanzado. En este estudio, se observó que los portadores homocigotos de la variante Arg72Pro presentaban mejor TR a platino (54,3% vs 29,1%), así como una mayor SLP y SG (148). Con respecto a las mutaciones en este gen y la respuesta a platino, en el estudio JBR.10 se evaluó también la presencia de mutaciones en p53: el 31% de los pacientes presentaban mutaciones en el gen, en estos pacientes la quimioterapia no produjo un beneficio en términos de supervivencia (HR 0,78 CI95% 0,46-1,32). Sin embargo, en los pacientes

con p53 nativo la quimioterapia proporcionó un beneficio en supervivencia (HR 0,67 CI95% 0,46-0,98) aunque esta relación no fue significativa en el análisis multivariante (145). Otro estudio sobre 35 pacientes con CPNM localmente avanzado sometidos a tratamiento neoadyuvante, mostró que la presencia de mutaciones en p53 se correlacionaba con la resistencia a la quimioterapia de inducción ($p>.002$). La sensibilidad de las mutaciones en p53 para identificar a los pacientes no respondedores a tratamiento fue del 94% (CI 71.3-99.9) (149). Otro de los mecanismos por los que p53 influye en la respuesta a platino podría ser la inducción de la expresión del gen GML por p53 en su estado natural. La expresión de este gen en tumores negativos para p53 se ha propuesto como marcador predictivo de respuesta a quimioterapia basada en platino (150). En un elegante estudio donde se generan diversos modelos murinos de CP a partir de la mutación de ras como evento iniciador (presente en el 30% aproximadamente de los tumores pulmonares humanos), con distintos estados alélicos para p53 (p53 normal, p53 nulo o mutantes condicionales), se observó que la pérdida de expresión de p53 no influía en la respuesta a platino en las fases iniciales del tumor. Los tumores inicialmente respondían al tratamiento con cisplatino mediante la detección del daño en el ADN, la parada en ciclo celular y la inducción de apoptosis, independientemente de la presencia o no de p53 y su diana transcripcional, la proteína p21. Sin embargo, la respuesta obtenida con cisplatino era distinta en aquellos tumores p53 negativos que en aquellos con p53 normal. Si bien todos ellos respondían al fármaco, los tumores con p53 conservado claramente regresaban, mientras que en aquellos con p53 negativo, el crecimiento simplemente se detenía (151).

7.4.2. *p21WAF/CIP1*:

P21WAF/CIP1 es una proteína inhibidora de las kinasas dependientes de ciclina (CDKi) que se activa por mecanismos dependientes e independientes de p53. Esta proteína inhibe la actividad del complejo ciclina/cdk2 y regula negativamente la progresión del ciclo celular. La ausencia o inactivación de p21 se ha relacionado con la resistencia a citotóxicos en numerosos modelos *in vitro* (152). En un estudio realizado sobre la línea celular A549 de CPNM, en el que se aumentaba la expresión de p21 mediante una técnica de activación genética inducida por ARN (mediante pequeñas moléculas de ARN de doble cadena dirigidas al promotor del gen p21) , se observó

que el aumento de la expresión de p21 se correlacionaba con la inhibición del crecimiento celular y el aumento de la sensibilidad a cisplatino. Además, en ratones xenotransplantados con estas células, el tratamiento intratumoral con cisplatino y la molécula de ARN activadora de la expresión de p21 inhibió el crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados únicamente con cisplatino, poniendo de manifiesto la relevancia de esta proteína en la sensibilidad al fármaco (153).

En el ámbito clínico, sin embargo, los niveles elevados de esta proteína parecen relacionarse con la resistencia a cisplatino, contrariamente a lo observado en los modelos preclínicos descritos. Un estudio donde se analizaron los niveles de expresión de p53 y p21 en linfocitos de sangre periférica entre pacientes con CP sensibles y resistentes a tratamiento con cisplatino, se observó un aumento significativo del ARNm de p53 y p21 en los pacientes en los que la quimioterapia fue inefectiva(154). En otro estudio se analizó la expresión de p53, bcl-2, p21, p27 y Ki67 por inmunohistoquímica, así como el índice apoptótico en los ganglios mediastínicos afectados de 33 pacientes con CPNM localmente avanzado sometidos a tratamiento neoadyuvante con platino. Los niveles elevados de p21 se correlacionaban con una peor supervivencia, así como con una menor respuesta al tratamiento (155).

7.4.3. *p27/KIP1*

Otra de las proteínas implicadas en ciclo celular es la proteína p27/KIP1. Esta proteína inhibe la fosforilación de la proteína Rb, necesaria para la transición G1-S en el ciclo celular. El arresto de las células en la fase G1 del ciclo las hace menos sensibles a los fármacos antitumorales. Además, esta proteína puede estimular o inhibir la apoptosis según el contexto celular. La sobreexpresión de p27KIP1 inhibe la apoptosis en CPM (156) , mientras que la neutralización de su ARN induce apoptosis en líneas celulares de CPNM (157). Por lo tanto, la disminución en esta proteína podría contribuir a la sensibilidad a quimioterapia mediante un retraso en la transición del ciclo celular y un incremento de la apoptosis. En el ensayo IALT (158), donde se demostró la utilidad de la quimioterapia adyuvante basada en platino tras la resección tumoral en CPNM, se analizó la expresión de varios componentes del ciclo celular (p27KIP1, p16INK4, ciclina D1, ciclina D3, ciclina E y Ki67) mediante inmunohistoquímica en 778 pacientes que participaron en el estudio. En los pacientes con tumores negativos para p27Kip1, la quimioterapia con platino resultaba en un

aumento en la SG en comparación con los controles (HR muerte 0,66 CI 95% 0,50-0,88, $p=0.006$). Sin embargo, aquellos pacientes tratados cuyos tumores presentaban tinción positiva para p27/KIP1 presentaban supervivencias semejantes a los pacientes no tratados. A partir de los resultados de este estudio, los autores concluyen señalando la importancia que podría tener esta proteína en la selección de pacientes para administración de quimioterapia adyuvante y paliativa, que debe confirmarse en subsecuentes estudios (159)

7.4.4. *Bcl-2*

Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis celular. Estudios sobre líneas celulares de CPNM donde se interfiere la expresión de esta proteína, han mostrado que su disminución o desaparición se relaciona con un incremento en la apoptosis y en la sensibilidad a platino en líneas celulares previamente resistentes (160), aunque estos resultados no son concordantes en todos los estudios realizados (161). Un estudio en el que se analizó la expresión de p53, Bcl-2, Bax y ERCC1 por inmunohistoquímica en 39 pacientes con CPNM localmente avanzado tratados con cisplatino, objetivó que los niveles altos de expresión de Bcl-2 se asociaban a una mejor respuesta al tratamiento (74% vs 30%) y a una mayor supervivencia global (20 meses vs 9 meses) (68).

7.4.5. *Survivina*:

La survivina es una proteína perteneciente a la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), y actúa como un inhibidor de las caspasas. La survivina no se expresa en tejido adulto sano, sin embargo su sobreexpresión es frecuente en muchos tumores. Esta proteína está implicada en la resistencia a cisplatino en CP. Estudios *in vitro* han mostrado que la silenciación del gen en líneas celulares de CP sensibilizan a las células a cisplatino, probablemente mediante la activación de la vía PI3K/AKT (162) (163). Además, en un estudio sobre 64 pacientes con CP, se objetivó sobreexpresión de survivina medida por hibridación *in situ* en tejido tumoral en 35 de ellos (58,3%). El 80% de los pacientes sin sobreexpresión tumoral de survivina presentaron respuesta parcial o total al tratamiento, mientras que entre los que tenían sobreexpresión, el 54,3% presentaron respuesta al fármaco. La supervivencia mediana de los pacientes con sobreexpresión de survivina fue de 14 meses, mientras

que aquellos sin sobreexpresión alcanzaron los 60 meses, lo cual podría reflejar su valor pronóstico (164). Otro estudio similar donde se cuantificó survivina, proteína inhibidora de apoptosis ligada a X (XIAP) y Smac por RT-PCR en biopsias transbronquiales de 72 pacientes con CPNM avanzado encontró que la baja expresión de survivina se correlacionaba con buena respuesta a la quimioterapia ($p=0,028$) (165).

7.4.6. Smac:

Otra proteína implicada en la resistencia a platino en la ruta de apoptosis es la proteína Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*), una proteína mitocondrial que promueve apoptosis. Estudios en líneas celulares de CPNM han mostrado que su disminución causa crecimiento celular y resistencia a platino, mientras que la reposición de su función sensibiliza a las células a este compuesto (166). Sin embargo, en el estudio anteriormente mencionado (165), no se halló correlación significativa entre los niveles de Smac y la respuesta a quimioterapia ($p=0,08$)

7.4.7. NPRL2:

La proteína NPRL2 está implicada en la sensibilidad a cisplatino mediante su acción sobre determinados componentes clave del control del daño en el ADN, como el sistema de reparación MMR, los puntos de control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis (167). Estudios preclínicos han mostrado su potente actividad supresora tumoral y su importancia en la respuesta/resistencia a cisplatino: En un estudio sobre 40 líneas celulares de CP donde se evaluó la expresión endógena de NPRL2 y la respuesta a cisplatino, se objetivó que la expresión de esta proteína se correlacionaba con la sensibilidad de las células al fármaco (coeficiente de correlación de Spearman - 0,677, $p<0.00001$). La transfección del gen en líneas celulares resistentes resultaba en una resensibilización de las células, con un 40% de incremento en la inhibición de la viabilidad celular y un aumento de la apoptosis de 2 a 3 veces, observaciones que se corroboraron en modelos murinos xenotransplantados (168). Otro estudio llevado a cabo sobre líneas celulares de CP muestra que la expresión de NPRL2 provoca un efecto sinérgico con el cisplatino en la activación de Chk1 y Chk2, lo que resulta en un

aumento de las proteínas controladoras del ciclo, y un mayor número de células detenidas en la fase G2/M del ciclo en las que se induce apoptosis. (169).

7.4.8. *TGFBI*:

La proteína TGFBI media la unión de la integrina celular a las proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina). La unión de la integrina a TGFBI se ha relacionado con procedimientos de adhesión celular, proliferación, migración y diferenciación, si bien su papel en cáncer es aún controvertido. En CPNM, se estudió la expresión de TGFBI por inmunohistoquímica en piezas tumorales de 47 pacientes con CPNM avanzado antes de recibir tratamiento quimioterápico. Los niveles altos de expresión en el tejido se asociaron a una mejor respuesta a quimioterapia, independientemente de otros parámetros como el sexo, la edad o la histología del tumor. Adicionalmente, la sobreexpresión de esta proteína en una línea celular de CP aumentaba la sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino y otros agentes quimioterápicos, mientras que al silenciar su expresión se observaba un aumento en la viabilidad celular y una disminución de la sensibilidad a los fármacos. TGFBI parece inducir la apoptosis celular mediante su unión a la integrina $\alpha\beta_3$, que provoca la inducción de la caspasa 8 y las caspasas 3 y 7 y el inicio de la ruta apoptótica en la célula tumoral (170)

7.5. Alteración de la señalización celular :

Las vías de señalización constituyen el medio por el cual se produce la comunicación intracelular. Las señales que la célula recibe desde el ambiente extra e intracelular, son transmitidas gracias a una serie de cambios proteicos que finalmente conducen a la modulación de la diferenciación, la división y la muerte celular. La mayoría de las señales se inician mediante la unión de un ligando a un receptor, de este modo se transmite la señal mediante la formación de complejos proteicos y la generación de segundos mensajeros. La alteración en las vías de señalización celular es uno de los fenómenos claves en la carcinogénesis y uno de los rasgos principales que caracterizan a las células tumorales. También es uno de los mecanismos propuestos por el cual los tumores desarrollan resistencia a quimioterapia.

7.5.1 Vía PI3K / AKT /mTOR:

La vía de PI3K/AKT/MTOR en CPNM ha cobrado especial interés en vista del creciente desarrollo de fármacos inhibidores de la misma. No obstante, también representa una de las vías fundamentales implicadas en la resistencia a platino, debido a su interrelación con importantes vías de señalización clásicamente involucradas en este proceso, tales como las vías de EGFR/HER2, MAPK o COX-2, así como con otras vías cuya implicación en este proceso ha sido descrita más recientemente, como la vía IGFBP3/IGF-I/IGFIR.

La proteína Akt es una proteína implicada en la transducción de señales que tiene un papel principal en la inhibición de la apoptosis. Akt fosforila varios de los elementos principales en la apoptosis, como la caspasa 9 y el regulador de apoptosis Bad. También puede suprimir de forma indirecta este proceso mediante la modulación de otras vías como la de NF- κ B, c-Jun NH2-terminal kinasa y p53 (171). En líneas celulares de CPNM se ha observado que esta proteína se encuentra constitutivamente activada en la mayoría de los casos, y que dicha activación confiere resistencia a quimio y radioterapia (172). La inhibición de la expresión de Akt mediante técnicas de ARN interferente sobre líneas celulares de CPNM sensibiliza a las células a cisplatino (173). En otro estudio realizado sobre muestras tumorales de 27 pacientes con CPNM operado, se han observado niveles elevados de fosfo-Akt1 (Akt activada). De esas mismas muestras se desarrollaron cultivos primarios celulares que fueron sometidos a tratamiento con dosis crecientes de cisplatino y se observó una estrecha correlación entre los niveles de fosfo-Akt1 encontrados en el tejido y la resistencia a cisplatino. Dicha resistencia parece depender de la activación de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K), como se comprobó sobre líneas celulares y ratones xenotransplantados al realizar tratamiento conjunto con cisplatino y un inhibidor de esta enzima. La serina-treonina kinasa MTOR, activada por Akt, está también implicada en la resistencia al fármaco. (174).

7.5.2. Vía COX-2:

También se ha propuesto la implicación de la enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2) en la resistencia a cisplatino. En líneas celulares de CP resistentes a platino, se ha hallado sobreexpresión de COX-2, y su inhibición se correlaciona con un aumento de

la apoptosis inducida por platino. COX-2 podría estar estabilizando la proteína Mcl-1, un factor de señalización antiapoptótico de la familia de Bcl-2 (175).

En el ámbito clínico, se ha observado que la enzima COX-2 está sobreexpresada en el 70% de los tumores de pulmón, especialmente en adenocarcinomas (176). Basándose en estudios preclínicos donde la administración de inhibidores de COX-2 incrementaba la quimio y radiosensibilidad de los tumores pulmonares, se han realizado varios ensayos clínicos combinando inhibidores de COX-2 con quimioterapia en CP: Un ensayo fase II con 24 pacientes con CPM diseminado en los que se combinó la administración de quimioterapia con cisplatino y etopósido en 6 ciclos con celecoxib hasta progresión, se obtuvieron TR de 56,5%, una SLP de 8,6 meses y una SG de 11,3 meses, a pesar de tener que cerrar el estudio prematuramente por cuestiones relativas a la seguridad del fármaco (177). Otro estudio fase II en 44 pacientes con CPNM avanzado añadió el fármaco meloxicam tomado diariamente a un régimen de quimioterapia de carboplatino y paclitaxel. Se obtuvo una TR del 43%, con una SG mediana de 15,9 meses, si bien a pesar de algunas toxicidades severas como neutropenia G4 en el 7% de los pacientes o una perforación yeyunal. (178). En un ensayo clínico fase II con 17 pacientes con CPNM estadio IIB y IIIA donde se combinó el tratamiento quimioterápico (doblete de platino) y radioterápico con celecoxib, se evidenció que este fármaco potenciaba moderadamente los efectos de la quimioterapia, con una TR del 42,9% y una SG de 203 días. (179).

7.5.3. Vía de MAPK:

La implicación de la vía de señalización mediada por las kinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPK) tiene especial interés en el mecanismo de acción de cisplatino. No obstante, la complejidad en los mecanismos de regulación de esta vía hace que sea difícil determinar a partir de la evidencia disponible el papel neto que desempeña en el desarrollo de resistencia a derivados platínicos.

Existen tres subfamilias principales de MAPK: las kinasas reguladas por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinases, ERK), las kinasas c-Jun-N terminal o kinasas activadas por estrés (c-Jun-N-terminal kinases, JNKs) y las

quinasas p38. Estas proteínas participan en la integración de las señales procedentes del medio extracelular para regular la proliferación, diferenciación, supervivencia celular y apoptosis, mediante su activación por MAPK-quinasas específicas. Su inactivación es mediada por fosfatasas duales específicas.

Dentro de la ruta de las MAPK, la vía de p38 ha sido identificada como un importante mecanismo para la supervivencia celular y la sensibilidad a platino en tumores pulmonares que se desarrollan en pacientes que no han sido fumadores. Es 10 veces más frecuente encontrar niveles altos de expresión de esta proteína en estos pacientes que en aquellos que son o han sido fumadores (180). Un estudio en líneas celulares procedentes de cultivos primarios de tumores pulmonares de pacientes no fumadores ha evidenciado que la inhibición farmacológica específica de p38 disminuye no solo la supervivencia de las células tumorales, sino que restablece la sensibilidad a platino en las líneas previamente resistentes. (181). Otros estudios han demostrado la conexión de p38 con importantes vías de señalización en este ámbito como p53, c-Abl o EGFR (182). Es también destacable el fino ajuste de la activación de esta kinasa, mediado entre otros por las kinasas MKK3 y MKK6. Tal y como se ha evidenciado en un estudio sobre líneas celulares, la interrelación entre ambas kinasas determina la activación de p38 y, en consecuencia, la sensibilidad o resistencia a platino, siendo MKK3 la mayor determinante de la activación de p38. (183)

La fosfatasa MKP1/CL100 es otro elemento de esta ruta claramente implicado en la sensibilidad a cisplatino en CP. Esta enzima regula la inactivación de las kinasas JNK e inhibe la activación transcripcional de c-Jun, un factor de transcripción necesario para la inducción de apoptosis en respuesta a platino. En un completo trabajo se revela el papel de MKP1 en este contexto: Mediante una técnica de ARN interferente (siRNA) contra esta fosfatasa sobre las líneas celulares H-460 y H-23 de CPNM, se observó un aumento en la activación de JNK y p38 en respuesta a platino y una mayor eficacia de este fármaco, estos mismos resultados se observaron al emplear un inhibidor específico de MKP1 sobre estas líneas. Estos hallazgos han sido confirmados en otros trabajos similares (184). Además se analizó el impacto de la inhibición de la expresión de MKP1 *in vivo*, para lo cual se realizaron xenoinjertos en ratones atímicos con la línea H-460 modificada para expresar el siRNA contra MKP1. El crecimiento de los tumores fue más lento en comparación con los tumores

generados a partir de la línea celular salvaje, y mostraban mayor sensibilidad a cisplatino. (185). La participación de MKP1 junto con las vías de NF- κ B y PI3K-Akt en la resistencia a platino también ha sido estudiada mediante técnicas de RNA interferente, y se ha observado una mayor quimiosensibilidad a este compuesto al inhibir conjuntamente MKP1 y NF- κ B o PI3K-Akt en líneas celulares, lo que plantea una potencial estrategia de quimiosensibilización a cisplatino en tumores resistentes con algunos de los fármacos antitumorales actualmente empleados en clínica, como bortezomib (inhibidor no específico de NF- κ B) o inhibidores de PI3K. (186).

7.5.4. Vía de HER-2:

La amplificación y sobreexpresión de HER-2 se ha asociado con una respuesta pobre a cisplatino en pacientes con cáncer de mama y ovario, así como en modelos *in vitro* de CPNM (187) (188) (189). En CPNM, un estudio sobre 73 pacientes en estadio avanzado reveló que la sobreexpresión de HER2, medida por inmunohistoquímica sobre muestras parafinadas, se asociaba a una peor respuesta a una primera línea de tratamiento basada en cisplatino, con un 61,9% de respuestas en los pacientes HER2 positivos frente a un 92,3% de respuestas en los HER2 negativos ($p=0.003$). Además, la mediana de supervivencia en los pacientes HER2 positivos fue de 10 meses, en comparación con los 14 meses de mediana observados en los HER2 negativos ($p=0.007$) (190). En otro estudio donde se comparaba la respuesta a dos ciclos de quimioterapia neoadyuvante basada en platino en 67 pacientes con CPNM, se observó una tendencia no significativa a la resistencia en los tumores HER2 positivos (191)

El mecanismo por el cual HER2 puede estar influyendo en la respuesta a cisplatino se basa en la activación por este receptor de las vías de Ras/MAPK y PI3K/AKT/mTOR, vías ya analizadas previamente en este contexto. HER2 provocaría, mediante la activación de Akt, la fosforilación de p21, disminuyendo sus niveles en el núcleo celular y atenuando así la actividad antiproliferativa de cisplatino. Además, la fosforilación de Akt promueve la activación y localización del protooncogén Mdm2 en el núcleo de la célula, este gen una vez activado reprime la expresión de p53. Por último, Akt provoca la inactivación de la proteína proapoptótica Bad (192). La imbricación entre estas vías y sus efectores es muy compleja y sujeta a una regulación muy fina aún no bien conocida.

7.5.5. Vía de IGFBP-3/IGF-I/IGF1R

La vía de señalización mediada por insulina y los factores de crecimiento similares a insulina (*Insulin-like growth factors*, IGFs) regula el crecimiento y el metabolismo en condiciones normales, pero también se le atribuye un papel relevante en el desarrollo de diversas neoplasias (193). IGFBP-3 es una proteína que se une al factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), impidiendo que éste se una a su receptor tirosin-kinasa IGF1R (*Insulin-like growth factor I receptor*, IGF1R) y bloqueando así su actividad mitogénica y antiapoptótica. En ausencia de IGFBP-3, la unión de IGF-I a IGF1R y a EGFR, provoca la activación de la vía PI3K/AKT/MTOR, que resulta en un aumento del crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular, así como en el desarrollo de resistencia a cisplatino.

En un estudio sobre 27 líneas celulares de CPNM se observó que la hipermetilación del promotor de IGFBP-3, con el consecuente silenciamiento de la expresión de este gen, era un hecho frecuente en líneas celulares resistentes a platino. Esta situación fue constatada de igual modo en 36 especímenes tisulares de CPNM en estadios I y II operados, donde se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el estatus de hipermetilación del promotor de IGFBP-3 y la sensibilidad *in vitro* a platino (metilación en el 74% de los tumores resistentes vs 12% de los tumores sensibles, $p < 0.001$). (194) . A partir de estos resultados, este grupo de investigación generó un perfil predictivo de resistencia a platino basado en la interacción entre IGFBP-3 con las vías de EGFR, IGF1R y PI3K/AKT, a partir de 10 líneas celulares humanas de CPNM y 25 muestras de tumores de pacientes. El perfil proporciona una sensibilidad y especificidad en la predicción de 0,84 y 0,9, respectivamente ($p = 0.0062$) (195)

7.5.6. Vía de Ras:

El estatus mutacional de K-ras se ha analizado en numerosos estudios clínicos sin que en ninguno de ellos se estableciera una correlación entre la presencia de alteraciones en este gen y la distinta respuesta a quimioterapia en CPNM. Ello va en concordancia con la evidencia preclínica disponible, en la que, a pesar de describirse varios mecanismos por lo cuales KRAS podría interferir con la acción del cisplatino (aumento de MDR1, aumento de metalotioneína-IIa, aumento de ERCC1), ninguno de

ellos ha sido observado en líneas celulares de CPNM. Es más, tampoco se han encontrado diferencias en la sensibilidad a varios agentes quimioterápicos (cisplatino, doxorubicina, carmustina, melfalán, mitomicina y etopósido) en relación a la presencia de mutaciones en K-ras en un panel de líneas celulares de CPNM (189, 196).

Como se puede extraer de la lectura de este apartado, existen numerosos factores y mecanismos por los cuales la célula tumoral adquiere resistencia a los compuestos derivados del platino. Dichos factores se hayan asociados en una intrincada red de conexiones aún no suficientemente esclarecida, y sujeta a una regulación muy fina y cambiante. De este hecho se deriva que el análisis individual de cada uno de estos factores es insuficiente para predecir la respuesta al tratamiento en un paciente concreto, y del mismo modo su manipulación aislada no consigue restablecer la sensibilidad a platino, salvo en modelos *in vitro* cuyo comportamiento difiere sustancialmente del tumor nativo. Por ello, se hace necesario el análisis integrado de estos mecanismos mediante técnicas de análisis masivo de la expresión génica, capaces de integrar la información de miles de genes pertenecientes a diversas vías para generar “perfiles” de expresión genética asociados a un determinado evento clínico. En el apartado siguiente se describirán los trabajos más importantes publicados en este campo.

8. PERFILES DE EXPRESION GENICA EN CPNM

En los últimos años, el avance tecnológico ha propiciado el desarrollo de diversas técnicas de análisis masivo de la expresión génica, que han sido aplicadas con éxito para la generación de perfiles de expresión relacionados con distintos eventos de la enfermedad tumoral, tales como la progresión clínica o la respuesta a los tratamientos. La mayor parte de los estudios se basan en el análisis de la expresión génica mediante la técnica de *microarrays*, si bien otras técnicas, como la de SAGE, también han sido empleadas con este fin. Comenzaremos con una referencia a las particularidades de cada una de las técnicas, para posteriormente revisar los trabajos más importantes publicados en CPNM.

8.1. *Microarrays*:

La técnica de *microarrays* es una técnica de alto rendimiento desarrollada a finales de la década de los 90 que permite analizar la expresión génica mediante la detección de secuencias de expresión para un momento evolutivo o condición celular determinada. Se basa en la hibridación entre las secuencias problema expresadas en el material a analizar (tejido, lisado celular, etc), con secuencias complementarias pertenecientes a genes que son conocidos, que se encuentran fijadas a un soporte sólido (cristal o membrana) llamado *microarray*. En este soporte o *microarray* se produce la reacción de hibridación o unión entre las secuencias de la muestra y las secuencias conocidas. Durante el procesamiento de la muestra, las secuencias de la muestra problema se marcan con fluoróforos que permiten su detección una vez ha ocurrido la reacción de hibridación en el soporte. Así, la emisión de fluorescencia en aquellos lugares donde la hibridación se ha producido es captada por un lector de fluorescencia. Las imágenes así obtenidas son analizadas mediante un programa informático que proporciona una información cualitativa y parcialmente cuantitativa de la expresión génica en la muestra analizada. (figura 4)

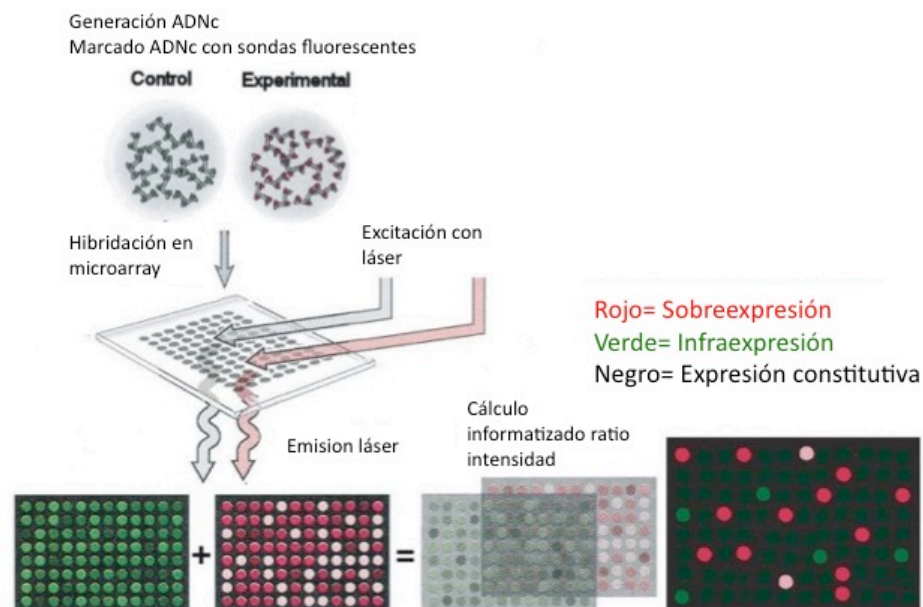


Figura 4: Esquema de la técnica de *microarrays*.

Algunos de los modernos *microarrays* permiten el análisis simultáneo de más de 25000 genes en la muestra problema, ofreciendo una visión cuasicompleta del genoma humano. Actualmente, sin embargo, su principal problema es que se trata de una técnica semicuantitativa, ya que analiza la expresión génica de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia emitida, este método no permite realizar una cuantificación en términos absolutos de la expresión génica. Además, el desarrollo de esta técnica en diferentes plataformas tecnológicas (Affymetrix, Agilent, Illumina) e incluso la variabilidad en el proceso técnico en sí, hacen que la extrapolación de resultados y la comparación entre distintos trabajos no permita extraer conclusiones sin aplicar una técnica de validación independiente de los resultados, como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (197)

8.2. SAGE:

La técnica de análisis seriado de la expresión génica (*Serial Analysis of Gene Expression*, SAGE), desarrollada por Velculescu y colaboradores a mediados de los 90, es una técnica cuantitativa de análisis génico masivo cuya principal ventaja con respecto a la técnica de *microarrays* es que realiza un análisis de la expresión génica en su totalidad, sin necesidad de limitar *a priori* el número de genes analizados. Así, este análisis incluye tanto genes conocidos en un proceso, como genes no conocidos, lo que permite la posibilidad de descubrir nuevos transcritos implicados en el evento estudiado. Además, debido a que se basa en la secuenciación, la cuantificación de los transcritos es precisa y reproducible.

Esta técnica se basa en el empleo de secuencias de ADNc de 10 a 14 pares de bases (pb), que identifican inequívocamente cada transcrito en una base de datos de secuencias. Estas secuencias cortas, llamadas etiquetas (*tags*), se obtienen desde la muestra problema, se amplifican y se unen unas a otras, formando secuencias más largas conocidas como concatémoros. Estos concatémoros se secuencian para identificar los *tags* correspondientes a los genes conocidos y los desconocidos, y cuantificarlos en la muestra.

Debido a la complejidad y laboriosidad del procedimiento, esta técnica no se emplea para llevar a cabo análisis de expresión de un gran número de muestras. Su interés, por el contrario, reside en la posibilidad de su empleo para el descubrimiento o

el cribado de genes relevantes en un proceso concreto, evitando el sesgo que supone seleccionar de antemano los genes a estudiar, y ofreciendo una información precisa acerca de su nivel de expresión para una condición concreta. La información obtenida mediante SAGE, puede ser validada posteriormente en un mayor número de muestras mediante PCR cuantitativa (198) .

En los últimos años, la técnica SAGE ha ido dando lugar a la técnica ChIP-seq también basada en secuenciación y que, por tanto, ofrece una cuantificación más exacta y permite conocer también la existencia de polimorfismos o mutaciones, por lo que esta técnica está desplazando progresivamente a la técnica de *microarrays* para el análisis genómico masivo.

8.3. Perfiles de expresión para la clasificación pronóstica del CPNM:

Bajo un mismo subtipo histológico de CPNM se encuentran diversas entidades moleculares con muy diferente comportamiento biológico y clínico. Por ello, las técnicas de análisis masivo de la expresión génica se han empleado para refinar la clasificación y aportar información pronóstica adicional a los datos clínico-patológicos empleados habitualmente. En el grupo de pacientes con CPNM precoz, su interés reside en identificar a aquellos pacientes con una mayor probabilidad de recaída de la enfermedad. Ello permitiría la racionalización del empleo de la quimioterapia adyuvante, evitando toxicidades innecesarias a aquellos pacientes con un perfil génico de buen pronóstico, y apoyando su uso en aquellos pacientes clasificados como “de alto riesgo” para la recaída. Por ello, la mayoría de estudios se han enfocado en la enfermedad temprana, mientras que en CPNM avanzado los estudios en este campo son escasos.

Garber y colaboradores analizaron 67 tumores pulmonares (16 epidermoides, 41 adenocarcinomas, 5 cánceres de célula grande y 5 carcinomas microcíticos) con *microarrays* de ADNc de 24000 elementos. El análisis de expresión reflejó perfiles genéticos concretos que se correspondían con cada uno de los subtipos histológicos analizados, y, en el caso del adenocarcinoma, pudieron reconocerse tres patrones de expresión génica diferentes que se asociaban con un distinto grado de diferenciación del tumor y diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes. (199). Bhattacharjee y colaboradores, aplicando un *microarray* con 12600

secuencias a 186 tumores pulmonares (21 epidermoides, 127 adenocarcinomas, 20 tumores carcinoides, 6 tumores microcíticos y 12 metástasis extrapulmonares) obtienen resultados similares, abundando en la subclasificación molecular de los diferentes subtipos histológicos de CPNM, y determinando la presencia de 4 subtipos moleculares diferentes de adenocarcinoma. Estos 4 subtipos, caracterizados por distintos patrones de expresión, también se asociaban a distinto grado de diferenciación, distinta historia de tabaquismo en el paciente y distinto pronóstico, siendo el subtipo neuroendocrino el que se asociaba a una menor supervivencia de los pacientes (200). Los patrones de expresión hallados en adenocarcinoma en ambos estudios fueron validados exitosamente en tres cohortes independientes de pacientes, probando así su reproducibilidad (201) .

Por otra parte, Nacht y colaboradores analizaron mediante SAGE la expresión génica en 9 muestras correspondientes a 4 tumores pulmonares (2 epidermoides y dos adenocarcinomas), una línea celular de adenocarcinoma pulmonar, y dos líneas celulares pulmonares no tumorales. Obtuvieron diversos perfiles genéticos asociados con las características biológicas y patológicas de las muestras de partida, en los que se describieron hallazgos de expresión diferenciales en el carcinoma epidermoide y en el adenocarcinoma. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente mediante análisis por qPCR y *microarrays* de ADNc en 43 muestras pulmonares normales y tumorales, lo que mostró la validez de los hallazgos obtenidos mediante SAGE aún a partir de un reducido número de muestras. (202) .

Beer y colaboradores desarrollaron un perfil o firma génica pronóstica de 50 genes en adenocarcinoma de pulmón a partir del análisis mediante *microarrays* de 86 muestras tumorales y 10 de pulmón normal. Este perfil clasificaba el adenocarcinoma de pulmón estadio I en dos grupos, de alto y de bajo riesgo, de acuerdo a la SG. Posteriormente, el mismo grupo estudió por el mismo procedimiento 129 muestras de carcinoma epidermoide, desarrollando un nuevo perfil pronóstico de 50 genes que dividía los casos en dos grupos (alto y bajo riesgo), según la SG. La clasificación del perfil era independiente del estadiaje clínico. Finalmente, combinando ambas firmas y aplicándolas a un set independiente de 72 muestras de CPNM en estadio I, encontraron que la firma combinada también podría predecir el pronóstico con una precisión del 71% (203) (204)

Larsen y colaboradores, también a partir de la técnica de *microarrays*, han desarrollado dos firmas génicas pronósticas para adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de pulmón. A partir de 48 muestras de adenocarcinoma (con estadio ganglionar N0) y 51 muestras de carcinoma escamoso (estadios I-III), con evolución clínica conocida, desarrollaron sendas firmas pronósticas mediante la comparación de los perfiles de expresión para aproximadamente 14.000 transcritos de los casos con recurrencia en los 18 meses siguientes a la resección con respecto a aquellos casos libres de recaída a los 36 meses. En el caso del adenocarcinoma, la firma de 54 genes obtenida predijo el pronóstico en dos cohortes de validación independientes, y se observó que la predicción era independiente del estadiaje clínico inicial. Para el carcinoma escamoso, la firma de 111 genes fue capaz de predecir la recurrencia en una serie independiente con un 72% de precisión, siendo superior a la clasificación TNM o al estadiaje ganglionar en predecir el pronóstico de los pacientes (205, 206).

Otra aportación importante es la del empleo de muestras parafinadas para el análisis masivo de la expresión génica. Si bien la conservación en congelación se está incorporando progresivamente a la rutina asistencial de los centros, la fijación en formol tamponado y posterior conservación en parafina es el método principal para el almacenaje y conservación de las muestras en el medio hospitalario. El empleo de muestras parafinadas, por tanto, amplía la posibilidad de selección de pacientes para el desarrollo de estos perfiles de expresión. En este sentido, Xie y colaboradores presentan una firma génica pronóstica de 59 genes desarrollada mediante *microarrays* a partir de muestras parafinadas de 75 pacientes con CPNM resecado. La firma divide a los pacientes en grupos de alto y bajo riesgo de acuerdo a la SG de los pacientes. Con el fin de demostrar que el perfil genético obtenido a partir de muestras parafinadas mantiene su validez al trasladarlo a otro tipo de muestras o de plataformas de análisis, los autores aplican dicho perfil a 3 series independientes de datos de *microarrays* publicados, estas series incluían datos procedentes de muestras en congelación y fueron obtenida con diversas plataformas de *microarrays*. El perfil es capaz de clasificar correctamente también a los pacientes de estas series, lo que los autores aportan como prueba de la robustez del mismo (207).

En aras de una más fácil aplicabilidad clínica, algunos grupos han intentado generar firmas génicas pronósticas que comprenden un número muy bajo de genes a

analizar. El análisis génico en estos casos se realiza mediante RT-PCR, una técnica más sencilla y barata que los *microarrays*, que puede emplearse en tejido parafinado, y que se encuentra disponible con facilidad en el entorno hospitalario. Además, este tipo de firma podría aportar información adicional, sencilla y fácilmente interpretable por el clínico, para la adopción de decisiones terapéuticas como la administración de quimioterapia adyuvante. Chen y colaboradores identificaron una firma génica a partir de 125 muestras congeladas de CPNM en estadios I-III que no recibieron tratamiento adyuvante. Mediante estudio combinado con *microarrays* y RT-PCR, identificaron una firma génica pronóstica que con tan solo 5 genes clasificaba a los pacientes en alto y bajo riesgo de recaída, comportándose como un factor independiente de predicción con respecto a otras variables clínicas clásicas. Esta firma fue validada en una cohorte independiente de 60 pacientes, y sobre datos de *microarrays* de 86 pacientes occidentales reportados en estudios previos (208). Lau y colaboradores, analizaron por qPCR sobre 147 muestras tumorales la expresión de 158 genes identificados previamente mediante la técnica de *microarrays*. Describieron un perfil de tres genes (STX1A, HIF1A y CCR7) capaz de clasificar los pacientes de acuerdo a su SG, y mejorando la capacidad predictiva de los factores clásicos como estadio o histología. Este perfil fue validado sobre dos series independientes de datos de *microarrays* de pacientes (209). En otro estudio con importante participación española, se describió un perfil de tres genes (CSF1, EGFR y CA IX) a partir del análisis de expresión de 29 genes por qPCR sobre muestras de 66 pacientes con carcinoma epidermoide. Este perfil clasificaba a los pacientes en alto y bajo riesgo con un 70% de precisión, con diferencias en la SG entre ambos grupos. Estos resultados fueron validados en una cohorte independiente de 26 pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón (210). Un reciente estudio publicado por Mitra y colaboradores, aporta una firma génica pronóstica de 4 genes capaz de estratificar pacientes con CPNM en estadio I a III en dos grupos de alto y bajo riesgo, cuyo principal interés reside en que ha sido desarrollada a partir de poblaciones americana y asiática, obteniendo resultados que resultarían reproducibles entre poblaciones geográficas y demográficas distintas (211). En la misma línea, Kratz y colaboradores presentan una firma génica de 12 genes para CPNM no escamoso, evaluable por qPCR sobre muestras parafinadas, y desarrollada sobre 361 muestras de CPNM de pacientes americanos. La firma fue validada sobre una cohorte de 433 pacientes americanos y otra cohorte de 1006 pacientes asiáticos. La firma divide a los pacientes en tres grupos de riesgo

independientes del estadio y de otros factores clínicos, con diferencias significativas en la SG a 5 años en ambas poblaciones analizadas. Los autores presentan este perfil génico destacando su cercanía al ámbito clínico real y la posibilidad de uso en distintos contextos poblacionales (212).

También se ha explorado la posibilidad de establecer perfiles génicos pronósticos a partir de los micro ARNs o miRNAs, pequeñas secuencias de ARN de 19 a 22 nucleótidos, no codificantes, cuya función es regular la expresión génica mediante la inhibición de la transcripción del ARN o el aumento de su degradación. Se estima que estas secuencias regulan alrededor de un 30% del genoma, influyendo sobre las vías de proliferación celular, muerte celular o expresión de factores de transcripción, lo que da idea de su importancia en cáncer. Yanaihara y colaboradores estudiaron más de 100 muestras pareadas de tejido tumoral pulmonar y tejido no tumoral adyacente, y hallaron 43 miRNAs expresados diferencialmente entre el tejido tumoral y el no tumoral. De ellos, la expresión baja del miRNA *let-7a* y la expresión elevada de *mir-155* se asociaban a una peor supervivencia en adenocarcinoma (213). Yu y colaboradores desarrollaron una firma de 5 miRNAs a partir de 56 casos de CPNM, capaz de estratificar a los pacientes en dos grupos de alto y bajo riesgo con diferencias en supervivencia global y libre de enfermedad (214). Raponi y colaboradores, a partir de 61 muestras de carcinoma epidermoide de pulmón y 10 muestras pareadas de tejido pulmonar sano, hallaron 15 miRNAs que se expresaban diferencialmente entre el tejido tumoral y el normal. A partir de estos hallazgos, identifican aquellos miRNAs relacionados con el pronóstico de los pacientes y encuentran que la expresión de miR-146b es capaz de predecir la SG de los pacientes a 3 años con una precisión del 78%. Este grupo, que ya había publicado una firma génica pronóstica de 50 genes (204), encuentra que la firma génica basada en miR-146b presenta una mayor precisión en la predicción pronóstica que la anterior. También evidencian un solapamiento de las vías biológicas a las que pertenecen tanto los genes de la firma génica previamente publicada, como los 15 miRNAs identificados posteriormente, fundamentalmente en la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y en la de la interleukina 6 (215).

Estos y otros estudios semejantes han mostrado la heterogeneidad que subyace tras la clasificación histopatológica del CPNM y han aportado potenciales

marcadores pronósticos moleculares que podrían ayudar a definir mejor el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, las diferencias en el diseño y desarrollo de estos estudios (diferencias poblacionales, reducido número de pacientes, inclusión de diversos tumores y estadios, diferencia en las plataformas técnicas y en el procesamiento de las muestras, etc) hacen que el rendimiento y la aplicabilidad clínica de estos perfiles sean difíciles de determinar cuando son tomados de manera individual. Por otra parte, la falta de solapamiento entre los genes que componen los distintos perfiles ha generado ciertas dudas acerca de su fiabilidad. Por ello, varios grupos de investigación han intentado “aunar” estos perfiles en un perfil único con la intención de obtener un modelo más robusto y aplicable a poblaciones heterogéneas, y que aporte una mayor precisión en la predicción de recurrencia. Lu y colaboradores realizaron un metaanálisis de los datos de expresión génica obtenidos en 7 estudios de *microarrays* de CPNM en estadio I, buscando genes diferencialmente expresados en relación a la supervivencia global (inferior a 2 años vs superior a 5 años). De 4905 genes seleccionados de estos estudios, identificaron una firma génica compuesta por 64 genes, capaz de diferenciar a los pacientes de alto y bajo riesgo con más de un 85% de precisión. De los genes seleccionados, 11 de ellos se relacionaban con el proceso de generación de metástasis, y 8 con el de apoptosis, aportando así plausibilidad biológica al modelo (216).

Otros grupos han intentado evaluar el valor de diversos clasificadores pronósticos desarrollados a partir del análisis de la expresión génica en conjunción con la información pronóstica procedente de datos clínicos, con el fin de optimizar la predicción pronóstica de los pacientes. Shedden y colaboradores llevaron a cabo un gran estudio retrospectivo multicéntrico donde evaluaron el rendimiento de diferentes clasificadores pronósticos basados en expresión génica sobre 442 muestras de adenocarcinoma de pulmón estadios I a III, seleccionadas y procesadas de acuerdo a un protocolo común. Varios de los clasificadores examinados mostraban una buena correlación con el desenlace clínico del paciente y la mayoría de ellos ofrecían una información predictiva más precisa cuando se combinaban con datos clínicos (217). Otro grupo, a partir de los datos de expresión del estudio anterior, generó una firma pronóstica de 12 genes aplicando un procedimiento de selección génica diferente al empleado en el estudio previo (sistema de selección génica combinatorial). Esta firma clasificaba a los pacientes en grupos de alto, intermedio y bajo riesgo con una mayor

precisión que los clasificadores encontrados por Shedden y colaboradores en su estudio previo. Además, la firma era capaz de predecir sensibilidad o resistencia a varios quimioterápicos habitualmente empleados en CPNM, si bien esta conclusión se obtuvo a partir de datos de expresión y quimiosensibilidad procedentes de líneas celulares (218).

Finalmente, Boutros y colaboradores han demostrado que es posible obtener numerosos perfiles génicos con valor pronóstico a partir de un solo set de muestras. Así, partiendo de un set previo de 147 muestras analizadas para 158 genes por RT-PCR, empleando un método de análisis semisupervisado que tuviera en cuenta las interacciones no lineales entre genes, identificaron una firma de 6 genes predictiva de supervivencia en pacientes con CPNM en estadio temprano que fue validada posteriormente en 4 cohortes independientes. Además, escogieron de los 158 genes analizados de partida, los 113 genes comunes a 4 sets diferentes de muestras analizadas, y generaron permutaciones de 6 genes para analizar su capacidad pronóstica en esos 4 sets de muestras. Si bien la firma génica descrita era superior en predicción al 99% de los 10 millones de firmas generadas, un 16,4% de esas firmas (en torno a 1.640.000) clasificaban a los pacientes en dos grupos con significación estadística, y alrededor de 1700 eran capaces de clasificar a los pacientes con mayor precisión que la firma generada por los autores. Con esta conclusión se resuelve la incógnita relativa a la heterogeneidad en los genes seleccionados en las diversas firmas genéticas desarrolladas, ya que dicha heterogeneidad no implicaría necesariamente que las firmas no fueran adecuadas para predecir el evento clínico para el que se desarrollan (219).

No obstante, la aplicabilidad clínica de estos perfiles aún es un objetivo a perseguir. Subramanian y Simon hacen un análisis crítico de los 16 estudios más relevantes publicados entre 2002 y 2009 sobre perfiles de expresión génica con valor pronóstico en CPNM, aplicando una serie de parámetros de evaluación estándar a todos ellos: idoneidad del diseño del estudio, validación del perfil sobre cohortes independientes y demostración de la utilidad clínica en relación a la predicción pronóstica obtenida mediante parámetros clínicos clásicos. Encuentran que ninguno de estos perfiles mejora la predicción pronóstica con respecto a los factores clásicos de predicción, además de encontrar problemas en el diseño y en el análisis de los

datos obtenidos. Basándose en estos hallazgos, los autores proponen una serie de recomendaciones para el desarrollo de futuros estudios en este campo (220). El ejemplo de Oncotype DX® como modelo de desarrollo exitoso de una firma génica pronóstica con valor clínico en oncología (en este caso para la predicción de riesgo de recurrencia en un subgrupo concreto de pacientes con cáncer de mama) es analizado en otra revisión de los mismos autores, enfatizando los puntos clave que deben guiar el desarrollo de estos perfiles con potencial uso en clínica (221).

8.4. Perfiles de expresión predictivos de respuesta a quimioterapia en CPNM:

En la misma línea que los estudios para predecir pronóstico en CPNM, se han desarrollado también perfiles de expresión génica para intentar determinar *a priori* la sensibilidad de los tumores a la quimioterapia o, más recientemente, al tratamiento con inhibidores de EGFR. En el caso de los inhibidores de EGFR, se ha descrito que la presencia de determinadas mutaciones en EGFR es predictiva de respuesta al tratamiento con estos fármacos, y actualmente, la determinación de dichas mutaciones es una técnica realizada en el ámbito asistencial con carácter rutinario para determinar la idoneidad del empleo de estos fármacos en pacientes con CPNM. Sin embargo, la respuesta a quimioterapia aún no ha podido relacionarse con la existencia de alteraciones puntuales en un determinado gen, por lo que se ha recurrido al análisis masivo de la expresión génica para intentar encontrar patrones de expresión capaces de predecir la sensibilidad o resistencia de un tumor a un determinado fármaco. Varios de estos estudios se basan en la determinación sobre líneas celulares tumorales establecidas de los perfiles genéticos de sensibilidad o resistencia al agente quimioterápico evaluado, otros estudios determinan dichos perfiles a partir de muestras tumorales primarias obtenidas de pacientes.

Gemma y colaboradores analizaron la expresión génica por separado en 2 sets compuestos por 10 y 19 líneas celulares de CP (epidermoide, adenocarcinoma y microcítico) en respuesta a la incubación *in vitro* con cisplatino, carboplatino, docetaxel, paclitaxel, gemcitabina, vinorelbina y 5-fluorouracilo, clasificando los distintos patrones de expresión observados en grupos de acuerdo a la sensibilidad o resistencia a cada uno de los fármacos. En ambos sets observaron que el patrón de expresión en respuesta a gemcitabina era diferente al observado para el resto de fármacos, que compartían un patrón de expresión similar en función de la sensibilidad

o resistencia a los restantes quimioterápicos. Así, sugieren que gemcitabina debe incluirse en los regímenes de combinación en primera línea, o considerarse en el tratamiento de segunda línea si no ha sido empleada previamente en el tratamiento del paciente (222).

Kikuchi y colaboradores analizaron mediante *microarrays* la expresión de 23040 genes en 33 muestras de tumores primarios pulmonares (22 adenocarcinomas y 11 carcinomas epidermoides) expuestos a 6 quimioterápicos habitualmente empleados en CPNM: cisplatino, docetaxel, paclitaxel, irinotecán, gemcitabina y vinorelbina. Las muestras, tras la resección quirúrgica, fueron procesadas para aislar las células tumorales y embeberlas en una matriz de colágeno y nutrientes adecuada para realizar estudios *in vitro* de sensibilidad a estos fármacos. Encuentran varias docenas de genes cuya expresión varía entre los tumores sensibles y los resistentes a uno o varios de los fármacos testados. Sin aportar un perfil de expresión concreto predictivo de respuesta a estos fármacos, estos autores proponen sus hallazgos, procedentes del análisis masivo de la expresión génica, como punto de partida para futuros estudios de quimiosensibilidad en CPNM (223).

Otro estudio asiático, conducido por Oshita y colaboradores, analiza mediante *microarrays* la expresión de 1176 genes en muestras procedentes de biopsia transbronquial de 47 pacientes con cáncer de pulmón avanzado, 29 de ellos CPNM, cuyo tratamiento de primera línea consistió en quimioterapia basada en platino. Se comparó la expresión génica observada en las muestras, obtenidas previamente al inicio del tratamiento, con la evolución clínica de los pacientes (respuesta a la quimioterapia). Observaron un incremento significativo en la expresión de nueve genes en los pacientes no respondedores, si bien estos hallazgos no fueron validados posteriormente (224).

Recientemente, un estudio llevado a cabo por Zhu y colaboradores, identificó una firma génica compuesta por 15 genes a partir de muestras tumorales de pacientes participantes en el estudio JBR.10, que analizaba el beneficio del tratamiento adyuvante con cisplatino y vinorelbina en CPNM temprano (estadios IB y II). La firma se desarrolló a partir de 62 muestras de pacientes pertenecientes al grupo control (no tratados con quimioterapia adyuvante), y dividía a los pacientes en 2 grupos de acuerdo a su riesgo de recaída, con diferencias significativas en la supervivencia

global de los pacientes. La firma fue validada en cuanto a su valor pronóstico en 4 sets independientes de datos de microarrays procedentes de tumores de pacientes en estadios IB y II no tratados con quimioterapia adyuvante, así como en 10 pacientes adicionales del brazo control del ensayo JBR.10 en los que se analizó la expresión génica por qPCR. Con respecto al valor predictivo, se realizó una validación cruzada interna del perfil mediante qPCR sobre las 133 muestras del ensayo JBR.10 que ya habían sido previamente analizadas mediante *microarrays* (62 pertenecientes a pacientes no tratados sobre las que se desarrolló el perfil y 71 procedentes de pacientes tratados con quimioterapia), y sobre 30 muestras adicionales del estudio que no habían sido previamente analizadas mediante *microarrays*, observándose que en aquellos pacientes tratados con quimioterapia adyuvante que presentaban una firma pronóstica de alto riesgo, la quimioterapia adyuvante prolongaba significativamente la supervivencia de los pacientes, mientras que en aquellos pacientes clasificados como de bajo riesgo, el empleo de quimioterapia adyuvante no solo no ocasionaba ningún beneficio, sino que podía ser incluso perjudicial. El estudio, primero en generar una firma pronóstica sobre muestras recogidas prospectivamente en un ensayo clínico fase III de quimioterapia adyuvante en CPNM, es además el primero en generar una firma que, además, tiene valor predictivo del beneficio de la quimioterapia adyuvante en el paciente (225).

Finalmente, ha sido recientemente publicado por Van Laar y colaboradores, un estudio en el cual se presentan dos firmas génicas para adenocarcinoma de pulmón en estadios I-III, una pronóstica de 160 genes y otra predictiva de beneficio de la quimioterapia adyuvante, de 37 genes. Ambas firmas sólo comparten un gen, lo que indica, según los autores, que el pronóstico y la respuesta a quimioterapia adyuvante son factores influenciados por factores moleculares propios. Este estudio, que se diseña de acuerdo a las premisas señaladas por Subramaninan y Simon para el correcto desarrollo de perfiles genéticos en cáncer, pone especial énfasis en una validación robusta de ambas firmas, mediante el empleo de series de de pacientes cuyos perfiles genómicos han sido obtenidos en diferentes centros y mediante diversas técnicas, acercándose al uso real de estos perfiles en la práctica clínica diaria (226).

Como puede concluirse de la lectura de este apartado, la generación de perfiles pronósticos y predictivos de respuesta en CPNM es un campo de importante repercusión clínica donde existen necesidades aún no resueltas. La mayor parte de los estudios publicados hasta ahora han sido desarrollados a partir de plataformas basadas en la técnica de *microarrays*. No obstante, las nuevas técnicas basadas en secuenciación masiva proporcionan información mucho más amplia que la obtenida hasta ahora. Este tipo de técnicas aportan información precisa y cuantitativa sobre expresión diferencial de genes, pero además aportan información sobre polimorfismos, diferentes transcritos generados a partir de *splicing*, imbalance alélico o mutaciones postranscripcionales, ampliando enormemente las posibilidades de análisis diferencial entre grupos de pacientes con distinto pronóstico o respuesta a tratamiento. La técnica predecesora de estas técnicas de secuenciación, el SAGE, ha sido la técnica empleada para el desarrollo del perfil genético en CPNM que se presenta en esta Tesis Doctoral.

Hipótesis y Objetivos

A pesar de los avances en su diagnóstico y tratamiento, a día de hoy el CPNM sigue siendo una enfermedad altamente letal. Para una misma situación clínica de partida, las diferencias observadas en la evolución de los pacientes hacen necesarias herramientas clínicas robustas y fiables que permitan definir con precisión y de forma individualizada la situación y el pronóstico de la enfermedad en cada enfermo. Estas herramientas deben cumplir una serie de requisitos necesarios para su aplicabilidad en la rutina diagnóstica: facilidad de realización en el entorno clínico, coste razonable, empleo de material biológico fácilmente accesible y sencillez en su interpretación, entre otros.

En CPNM avanzado, la quimioterapia, principalmente los esquemas basados en platino, siguen siendo el pilar fundamental del tratamiento para la mayoría de los pacientes. La respuesta a la quimioterapia es un factor determinante del pronóstico de estos pacientes por su efecto positivo sobre la supervivencia, mientras que la resistencia al tratamiento constituye en sí un factor de pronóstico adverso. Por ello los factores relacionados con la sensibilidad o resistencia a la quimioterapia podrían relacionarse en último término con el pronóstico de estos pacientes.

Numerosos estudios han establecido el papel predominante de diversos genes y rutas de señalización en la patogenia y progresión del CPNM, así como su implicación en pronóstico y respuesta al tratamiento, sin que ninguno de ellos haya podido incorporarse a la predicción pronóstica de manera rutinaria. Las técnicas de análisis genético masivo permiten analizar simultáneamente la expresión de numerosos genes para una condición determinada. Entre todas ellas, la técnica de SAGE permite además el descubrimiento de nuevos genes implicados en un proceso concreto ya que no requiere la definición previa de los genes a estudiar. La complementariedad de ambas fuentes de información (evidencia científica disponible y estudios no dirigidos de la expresión génica) puede ayudar a definir perfiles de expresión con valor predictivo y pronóstico en CPNM.

Con estos antecedentes pretendemos realizar un estudio de expresión génica en pacientes con CPNM avanzado, encaminado a la búsqueda de perfiles de expresión génica con valor pronóstico y/o predictivo de respuesta al tratamiento. Para

la selección de los genes candidatos, emplearemos por un lado genes procedentes del estudio de la expresión génica diferencial en tumores sensibles y resistentes a platino, y por otro lado incorporaremos genes con valor pronóstico y predictivo de respuesta constatado en la literatura.

La hipótesis de trabajo del presente estudio sería: el análisis de la expresión genica de una colección de genes seleccionados a partir de dos fuentes (análisis no cribado de la expresión génica mediante SAGE y selección a partir de la bibliografía) es capaz de determinar grupos diferenciados de pacientes con CPNM avanzado de acuerdo a su pronóstico y/o respuesta a la quimioterapia.

La hipótesis nula sería: No es posible establecer un perfil de expresión génica a partir de los genes seleccionados que pueda clasificar a los pacientes de acuerdo a su distinto pronóstico y/o respuesta a la quimioterapia.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Definir nuevos genes potencialmente implicados en respuesta a platino, y con potencial valor pronostico mediante el estudio de las diferencias en la expresión génica entre tumores sensibles y resistentes a cisplatino a través de la técnica de SAGE.
2. Estudiar mediante qPCR la expresión de un perfil mixto de genes (cribado SAGE y selección dirigida a partir de la literatura disponible) en un grupo de pacientes con CPNM avanzado sometidos a una primera línea de tratamiento basada en platino.
3. Establecer la asociación entre los niveles de expresión de estos genes y el pronóstico de los pacientes, determinado por la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, así como con la respuesta al tratamiento.
4. Definir un perfil predictivo de respuesta y pronóstico a partir de los genes considerados relevantes, con potencial aplicabilidad en el ámbito clínico-asistencial como herramienta de rutina.
5. Establecer el valor de dicho perfil basado en la expresión génica con respecto a los factores clínico-patológicos clásicos empleados en la predicción pronóstica.

Materiales y Métodos

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de expresión génica en pacientes con CPNM avanzado. Los genes estudiados provienen, por una parte del estudio no dirigido de la expresión diferencial entre tumores sensibles y resistentes a cisplatino, y por otro, de una selección bibliográfica atendiendo al valor predictivo y pronóstico de genes ya estudiados en este contexto.

El flujo de trabajo en el estudio presentado es como sigue: En primer lugar, se realizó un análisis *in vitro* de sensibilidad a cisplatino sobre tumores pulmonares primarios en fresco. Para ello, se emplearon muestras de tumores pulmonares de pacientes operados por CPNM en estadios tempranos, que fueron disgregadas e incubadas con cisplatino a concentraciones crecientes para determinar su sensibilidad al fármaco. Así, se escogieron aquellos tumores con un perfil más acusado de sensibilidad o resistencia para realizar el estudio no dirigido de la expresión génica mediante la técnica de SAGE. Los genes seleccionados mediante esta técnica, junto con los genes seleccionados mediante revisión bibliográfica sirvieron para confeccionar las tarjetas de qPCR que se emplearon para el estudio de expresión en pacientes con CPNM avanzado.

El estudio de expresión de pacientes con CPNM avanzado se realizó sobre muestras parafinadas procedentes de biopsia, en la mayor parte de los casos, dicho material correspondió al empleado para el diagnóstico de estos pacientes. La expresión génica se analizó mediante las tarjetas de qPCR diseñadas con los genes seleccionados en la primera parte del trabajo.

A continuación se exponen los detalles relativos a muestras, pacientes y métodos empleados en el estudio. Hemos estructurado la información de acuerdo a las distintas partes del estudio que se han expuesto: el primer apartado se centra en el estudio *in vitro* de la sensibilidad a cisplatino sobre tumores primarios pulmonares y en el análisis mediante SAGE de la expresión génica de los tumores seleccionados en dicho estudio, también se explicará la confección de las tarjetas de qPCR mediante los genes procedentes del estudio SAGE y de la bibliografía. El segundo apartado expone el estudio de expresión mediante qPCR de los genes seleccionados sobre muestras de biopsia de pacientes con CPNM avanzado.

1. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A CISPLATINO EN TEJIDO FRESCO TUMORAL, ANÁLISIS SAGE Y CONFECCIÓN DE LAS TARJETAS DE QPCR:

1.1. Pacientes y muestras:

Para el estudio de sensibilidad a cisplatino y el análisis SAGE, se emplearon muestras tumorales provenientes de pacientes con CPNM en estadios precoces que fueron operados en el Hospital La Paz, previa obtención del Consentimiento Informado del paciente para la cesión de material biológico.

Tras la confirmación de la existencia de tejido tumoral por el patólogo en el hospital, las muestras se procesaron de forma inmediata. Sólo se emplearon muestras con un porcentaje de tumor superior al 70% para garantizar un enriquecimiento adecuado en tejido tumoral. El tejido empleado para el estudio se dividió en dos porciones: Una porción de tejido fue procesada para el análisis de sensibilidad a platino (ver apartado siguiente) y la otra porción se embebió en resina crioprotectora (OCT) dentro de un cassette, para su conservación a -80°C. Esta segunda porción fue la que se utilizó con posterioridad para la realización del estudio de SAGE en los tumores seleccionados.

1.2. Estudio in vitro de sensibilidad a cisplatino sobre muestras tumorales en fresco:

Para el análisis de sensibilidad a cisplatino, el tejido destinado a este fin fue desmenuzado mecánicamente en pequeños fragmentos, que fueron posteriormente filtrados con una malla de nylon. Tras esta primera disgregación tisular grosera, se introdujo el tejido tumoral en un tubo estéril con medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) al que se añadieron colagenasa tipo II, hialuronidasa (sigma Aldrich), y antibióticos. La disgregación celular se llevó a cabo durante 20 minutos en agitación, tras lo cual se lavaron y se resuspendieron las células obtenidas en el mismo medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino.

Se realizaron alícuotas de esta suspensión celular de 50 µl, que se dispusieron en placas de 96 pocillos. Se añadió cisplatino a concentraciones crecientes (0, 0,01, 0,1, 1 10 y 100 µg/ml), y se realizó una incubación durante 7 días de las células en presencia del fármaco, en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Cada una de las concentraciones se ensayó por cuadruplicado. Tras este período, se midió la

viabilidad celular mediante la técnica de AlamarBlue®: Se añadió AlamarBlue® a concentración del 10% a cada uno de los pocillos, se incubaron las placas durante 3 horas y tras este período se midió la densidad óptica a 570 y 600 nm en un espectrofotómetro. La viabilidad celular se calculó de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante (Biosource Europe, Nivelles, Belgium). A partir de estos datos se calculó la concentración de cisplatino capaz de eliminar al 50% de las células con respecto al control (IC50). Se seleccionaron para el análisis de SAGE 6 tumores de acuerdo a su sensibilidad a cisplatino: los 3 tumores que mostraron una mayor sensibilidad al fármaco (IC50 más bajas) y los 3 tumores con mayor resistencia (IC50 más altas).

Este estudio de sensibilidad fue realizado en el laboratorio de la Dra. Rosario Perona en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols.

1.3 Análisis SAGE:

Para el análisis SAGE se emplearon muestras criopreservadas en OCT correspondientes a los 6 tumores seleccionados en el estudio *in vitro* de sensibilidad a cisplatino. La técnica de SAGE es una técnica en la que se produce, a partir del ARN mensajero de la muestra a analizar, una molécula compuesta por múltiples fragmentos de transcritos llamados *tags* o etiquetas que representan inequívocamente a los genes que se están expresando. La secuenciación de varias de estas moléculas o concatémoros permite la identificación y cuantificación de los genes expresados en nuestra muestra problema. Brevemente, se citan los pasos más importantes de la técnica (figura 5):

- Corte de la muestra tumoral (se extrajeron 20 secciones de 5 micras de grosor) y homogenizado de las secciones.
- Extracción de ARNm.
- Generación de ADNc de doble banda unido a esferas magnéticas, para poder aislarlo con un imán.
- Digestión con enzima NlaIII.

La generación de las librerías por la técnica SAGE se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de microSAGE, versión 1.0e, del 22 de Junio de 2000 (disponible en <http://www.sagenet.org>). La secuencia y la cuantificación de expresión de cada uno de los *tag* se ha determinado usando el programa informático SAGE 2000 análisis software 4.5 (<http://www.sagenet.org>) (28). Éste crea las genotecas de transcritos y realiza, a su vez, el estudio estadístico que validará los resultados. Para ello emplea el análisis o simulación de Monte Carlo.

Los genes correspondientes a los *tags* se identificaron mediante la página web “SAGE Genie” disponible en la dirección <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>. Para realizar la selección de genes candidatos se siguieron los siguientes pasos: en primer lugar se realizó una comparación de los niveles de expresión por grupos, separando los tumores analizados en dos grupos de acuerdo a su sensibilidad a cisplatino (sensibles o resistentes). Se sumaron, para cada uno de los grupos, el número de copias de cada gen en cada uno de los tumores individuales. El primer criterio de selección fue que el número de copias cambiase significativamente entre el grupos de tumores resistentes y el de tumores sensibles. De entre los genes seleccionados en este primer paso, se escogieron aquellos genes que se encontrasen sobreexpresados en el grupo de tumores resistentes con respecto al grupo de tumores sensibles. El tercer criterio aplicado sobre este nuevo grupo de genes fue que la sobreexpresión pudiera evidenciarse en cada uno de los 3 tumores resistentes a platino de forma individual. Finalmente, se consideró el posible valor funcional de los genes que cumplían estos criterios basándonos en los datos procedentes de la literatura.

Además se realizó un estudio ontológico de rutas utilizando el programa informático GeneMania (<http://www.genemania.org/>) a partir de los genes sobreexpresados significativamente en el grupo de tumores resistentes a platino (segundo criterio de selección explicado arriba) con el fin de agrupar los genes hallados mediante el análisis SAGE e identificar potenciales rutas o procesos relacionados con el proceso de resistencia a cisplatino.

1.4. Confección de las tarjetas de qPCR:

La selección de genes a analizar mediante qPCR se realizó a partir de dos fuentes:

- Análisis de la expresión génica mediante SAGE de tres tumores sensibles y tres resistentes al tratamiento con cisplatino (Expuesta). Se escogieron 6 genes.
- Selección dirigida a partir de los datos de la bibliografía: Tras una revisión de la bibliografía existente sobre la base de datos Pubmed, se seleccionaron 9 genes relacionados con la respuesta tumoral a cisplatino, así como genes implicados en el equilibrio REDOX, la transición epitelio-mesénquima y otros procesos relacionados con el pronóstico de la enfermedad. La selección se realizó incorporando por un lado genes clásicamente relacionados con el pronóstico de la enfermedad o la predicción de la respuesta a platino en CPNM, y por otro lado genes potencialmente implicados en alguna de las rutas o procesos identificados en el estudio ontológico realizado previamente a partir de los datos de SAGE.
- Se incluyeron además 3 genes *housekeeping*, cuya expresión es constitutiva y no está sujeta a variación. Los cambios de estos genes reflejan cambios en la cantidad de ADNc y sirven, por tanto, para normalizar los resultados. Los genes son ACTB, GAPDH y PGK1.

2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE QPCR EN PACIENTES CON CPNM AVANZADO:

2.1. Pacientes y muestras:

Se ha realizado un estudio retrospectivo en el que se han relacionado los datos clínicos y anatomopatológicos de pacientes que cumplían una serie de requisitos fijados con anterioridad a la recogida de datos, con los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los genes seleccionados. La información correspondiente a los pacientes fue obtenida de sus historiales médicos de forma independiente, fue codificada para facilitar la interpretación de la misma y garantizar la fiabilidad de los

resultados obtenidos, y se ha asegurado su confidencialidad mediante el empleo de claves numéricas para la identificación de los sujetos de los que provenía. El proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital La Paz.

Se han recogido 65 muestras de tejido tumoral pulmonar fijado en formaldehído al 10% e incluido en parafina (en adelante, muestras parafinadas), procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, correspondientes a 65 pacientes diagnosticados de CPNM en estadio diseminado o localmente avanzado inoperable. La selección de estos pacientes se ha realizado utilizando la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, mediante la identificación de aquellos pacientes atendidos por esta patología entre los años 2002 y 2010. Tras comprobar la disponibilidad de muestra parafinada sobre la que se hubiera realizado el diagnóstico de CPNM, se ha procedido a la comprobación de los requisitos mínimos clínicos y patológicos necesarios para la inclusión en el estudio. Posteriormente, se han recogido los datos relativos al diagnóstico de CPNM y su evolución clínica.

Los criterios de selección para la inclusión de pacientes fueron:

- Edad superior a 18 años.
- Diagnóstico anatomopatológico confirmado de CPNM.
- Disponibilidad de muestra tisular parafinada, procedente de biopsia, con una proporción de células tumorales superior al 80%.
- Estadios IIIA - IV de la AJCC
- Presencia de enfermedad tumoral evaluable por criterios RECIST en el momento de la administración del tratamiento quimioterápico. Para ello, se requirió la existencia de pruebas de imagen (TC, RNM, PET-TC), realizadas como estudio de extensión de la enfermedad al menos en los dos meses previos a la administración de dicho tratamiento. Se excluyeron pacientes con lesiones cerebrales como única enfermedad medible, considerando las diferencias existentes en la biodisponibilidad de los fármacos en esta localización anatómica y el empleo habitual de radioterapia para el tratamiento de estas lesiones. Ambos factores producen una distorsión en la interpretación de la respuesta al tratamiento con respecto a la enfermedad de localización extracraneal.
- Tratamiento quimioterápico basado en derivados del platino como terapia de primera línea.

-
- Seguimiento clínico superior a 12 meses, o hasta progresión de la enfermedad o fallecimiento del paciente.

Los datos clínicos al diagnóstico y de la evolución de la enfermedad que se recogieron fueron:

- Edad al diagnóstico
- Sexo del paciente
- Grado de tabaquismo, medido en paquetes-año, previo al diagnóstico
- Clasificación anatomopatológica del tumor.
- Estadío TNM al diagnóstico (utilizando los datos de TC, PET-TC, y otras pruebas de imagen según disponibilidad)
- Estado general y funcional previo al tratamiento, medido según la escala ECOG
- Esquema de quimioterapia administrado
- Numero de ciclos administrados
- Grado de respuesta al tratamiento quimioterápico de primera línea(completa, parcial, estabilización de la enfermedad o progresión). Esta evaluación se realizó de acuerdo a criterios RECIST para las pruebas de imagen, tomando como prueba basal la obtenida previamente al inicio del tratamiento, y como comparativa, la prueba análoga realizada tras tres ciclos de tratamiento quimioterápico. En los casos de fallecimiento del paciente previo a la evaluación de respuesta, se interpretaron los datos clínicos disponibles para determinar si el fallecimiento fue debido a progresión de la enfermedad o a otras causas.
- Tiempo hasta la progresión de la enfermedad.
- En los pacientes fallecidos: supervivencia global.

Los especímenes tisulares procedentes de biopsias y de piezas quirúrgicas fueron evaluados por un anatomopatólogo experto. El tratamiento quimioterápico administrado se decidió en base a las características del paciente y los protocolos de tratamiento vigentes en el Hospital. La evaluación de la respuesta al tratamiento se realizó con TC de tórax y abdomen tras tres ciclos de quimioterapia. Tras finalizar el tratamiento (de 4 a 6 ciclos de quimioterapia según la respuesta observada), el seguimiento se realizó trimestralmente durante los dos primeros años, y posteriormente cada 6 meses. Dicho seguimiento constaba de examen físico, analítica sanguínea con recuento hematológico y bioquímica básica, TC de tórax y abdomen, y

pruebas de imagen adicionales a criterio clínico según sospecha diagnóstica (TC o RNM cerebral, RNM o ecografía hepática, gammagrafía ósea, etc.).

2.2. Procesamiento de las muestras:

1. Extracción del ARN total:

Para llevar a cabo la extracción de ARN total, se prepararon de 5 a 10 secciones de 5 µm de grosor de tejido parafinado correspondiente a la muestra tumoral. Se empleó el kit Masterpure RNA Purification (Epicentre) para realizar este procedimiento, de acuerdo a las pautas habituales descritas por Cronin et al (229). En un primer momento el tejido se desparafina y se rehidrata, mediante el empleo de xilol y lavado con alcoholes de grado decreciente desde 100% a 70%. Posteriormente el tejido se trata con proteinasa K y a continuación con DNasa I, para digerir el tejido y el ADN. El ARN de la muestra se precipita con isopropanol , y posteriormente se comprueba la concentración y pureza del mismo mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La calidad de los distintos ARN fue también comprobada mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2. Síntesis de ADN complementario:

A partir del ARN total extraído en el paso previo, se llevó a cabo la síntesis de ADNc para su posterior amplificación. Se empleó el kit High-Capacity cDNA archive (Applied Biosystems). De acuerdo al protocolo del mismo, realizamos la reacción de transcripción reversa a partir de 200 ng de ARN total de cada una de las muestras, empleando hexámeros al azar como cebadores. El programa utilizado para la reacción de amplificación fue:

- 1º: 10 minutos a 25°C

- 2º: 120 minutos a 37°C

2.3. Reacción de qPCR:

La reacción de qPCR sirve para amplificar el ADNc presente en cada una de las muestras. Conforme se produce un aumento en la amplificación de ADNc, se

incrementa progresivamente la señal fluorescente con la que están marcados los ADNc que se obtienen. La medida de esta señal permite la cuantificación del ADNc.

Las reacciones de qPCR se realizaron sobre tarjetas microfluídicas (Taqman Low Density Arrays, Applied Biosystems) que permiten el análisis simultáneo por qPCR de distintos ADNc en una o varias muestras. En cada uno de los puertos de la tarjeta, se emplearon 50 µl del ADNc obtenido previamente, y 50 µl de Taqman Universal PCR Master Mix. Para realizar la qPCR, se utilizó el termociclador ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) perteneciente al Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid.

Las amplificaciones se hicieron por triplicado, de modo que la expresión de cada gen, expresada por el valor Ct (umbral) se midió por triplicado. Para aplicar la normalización se estudiaron los tres genes *housekeeping* escogidos (ACTB, PGK1 y GAPDH). De ellos, el gen ACTB fue el que presentó un comportamiento más estable en nuestra serie, por lo que los datos de expresión génica se normalizaron frente a la expresión de ACTB.

2.4. Análisis estadístico:

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete informático SPSS v19.0.

Estadística descriptiva.

Para resumir los datos de las diferentes variables se calcularon los estadísticos descriptivos correspondientes en función del tipo de variable. En el caso de variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas de cada modalidad de la variable y las frecuencias relativas expresadas en porcentajes. En las variables cuantitativas se calcularon las medidas de tendencia central media o mediana. Como medidas de dispersión se utilizó la desviación típica y el recorrido de la variable.

Estadística inferencial

En las variables cualitativas se aplicó el test de chi al cuadrado con la corrección de Yates y en el caso de tablas de 2x2 la prueba exacta de Fisher. Antes de proceder

a la aplicación de test de hipótesis para variables cuantitativas se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) para estudiar el tipo de distribución que seguía la variable (normal, no normal). En las variables donde la prueba KS indicara que seguía una distribución normal se aplicaron pruebas paramétricas (t de Student) y en caso contrario test no paramétricos (Wilcoxon, U de Mann-Whitney).

Normalización de Ct

Como paso previo al análisis de los datos procedentes de la qPCR se procedió a la normalización de los mismos frente a la expresión del gen ACTB. Se aplicó la normalización frente a este gen sobre toda la muestra de pacientes, mediante el método $2\Delta Ct$:

$$\text{Dif expresión} = 2^{- (\text{Ct gen de interés} - \text{Ct gen ACTB})}$$

Para llevar a cabo la normalización se utilizó el programa Gennorm.

Análisis de un perfil de expresión pronóstico

Con la finalidad de obtener una ecuación que nos permitiera crear un *score* o puntuación pronóstica utilizamos el modelo multivariante de riesgos proporcionales de Cox. Para hallar dicha ecuación en primer lugar se realizó un análisis univariante en el que se incluyeron la totalidad de genes analizados. Aquellos genes que mostraron una asociación estadísticamente significativa o que mostraron una tendencia hacia la significación ($p \leq 0.15$), fueron considerados en el análisis multivariante. Este tipo de selección basada en la tendencia se ha realizado en estudios previos similares con muestras pequeñas de pacientes, donde la heterogeneidad subyacente podría enmascarar el impacto de la expresión génica en el pronóstico (230) . Para la generación del perfil pronóstico se utilizó el modelo de regresión de Cox por pasos “hacia delante” de selección de variables.

Para estimar y crear las curvas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global se utilizó el método de Kaplan-Meier. Para comparar dichas curvas se utilizó la prueba de Log-rank. El análisis multivariante de Cox se usó para evaluar los factores pronósticos independientes asociados con la supervivencia. Como covariables se utilizaron la firma de 2 genes, el ECOG y el tipo histológico. Todas las

pruebas de hipótesis fueron bilaterales (dos colas) con un nivel de significación del 5% y una potencia del 80%.

Análisis de un perfil de expresión predictivo de respuesta a tratamiento:

Para estudiar la asociación entre los niveles de expresión génica y la respuesta al tratamiento, se compararon en primer lugar las medias de los niveles de expresión de cada uno de los genes según la respuesta a quimioterapia, siendo ésta categorizada en respuesta o estabilización de la enfermedad vs progresión de la misma. Posteriormente, aquellos genes que mostraron diferencias de expresión significativas entre ambos grupos de respuesta a tratamiento o que mostraron una tendencia hacia la significación ($p \leq 0.15$), fueron incorporados al análisis multivariante, que se realizó con un modelo de regresión logística binaria. Para la generación del perfil predictivo se aplicó un análisis discriminante por pasos “hacia delante”. Todas las pruebas de hipótesis fueron bilaterales (dos colas) con un nivel de significación del 5% y una potencia del 80%.

Resultados

A continuación, exponemos los resultados del trabajo agrupados de acuerdo a la división cronológica presentada en el apartado de material y métodos. En primer lugar se presentarán los resultados de estudio de sensibilidad a cisplatino en muestras quirúrgicas de tumores pulmonares tempranos y la selección de los tumores para el análisis no dirigido de la expresión génica mediante SAGE. El segundo apartado mostrará los resultados de dicho estudio SAGE y los genes seleccionados a partir del mismo. En el tercer apartado se expondrá la confección definitiva de las tarjetas de qPCR con los genes provenientes del estudio SAGE y de la revisión bibliográfica. Finalmente, el cuarto apartado corresponderá al estudio de expresión por qPCR de los genes seleccionados sobre muestras parafinadas de biopsias correspondientes a una muestra de pacientes con CPNM avanzado sometidos a tratamiento con quimioterapia basada en platino.

1. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A CISPLATINO EN TEJIDO FRESCO TUMORAL:

El punto de partida de nuestro estudio es el análisis de la sensibilidad a cisplatino en tumores primarios pulmonares. Se estudió la sensibilidad a cisplatino sobre 20 muestras de tejido fresco tumoral procedente de piezas quirúrgicas de pacientes operados por CPNM temprano. De estas 20 muestras, un 45% se comportaron como resistentes a platino (9 muestras), un 40% como sensibles (8 muestras) y un 15 % mostraron un patrón de sensibilidad variable (3 muestras). De ellas, se seleccionaron los 6 tumores con un perfil de sensibilidad o resistencia cisplatino más acusado, de acuerdo a las IC50 observadas en el estudio de sensibilidad: los 3 tumores que mostraron una mayor sensibilidad al fármaco (es decir, aquellos con IC50 más bajas) y los 3 tumores con mayor resistencia al fármaco (y que por tanto presentaron las IC50 más altas). Las características clínico-patológicas de los 6 casos seleccionados se muestran en la tabla 1.

Nº Paciente	Edad	Sexo	Tipo histológico	pT	pN	IC50 cisplatino mcg/ml	Sensibilidad
1	50	varón	Epidermoide	2	0	5	resistente
2	75	varón	Epidermoide	2	0	0,8	sensible
3	64	varón	Epidermoide	3	0	0,001	sensible
6	61	varón	Epidermoide	2	1	10	resistente
11	45	varón	Célula Grande	4	1	0,1	sensible
20	59	varón	Epidermoide	3	1	10	resistente

Tabla 1: Casos seleccionados para el estudio de SAGE.

2. ANÁLISIS SAGE:

En segundo lugar, se procedió al estudio no dirigido de la expresión génica mediante la técnica de SAGE de los 6 tumores seleccionados en el estudio *in vitro* de sensibilidad a cisplatino. Para ello, se emplearon las muestras tumorales criopreservadas de los tumores, de las cuales se obtuvieron secciones que se homogeneizaron constituyendo el material a partir del cual se realizó el análisis. De los seis tumores cuya expresión fue analizada por SAGE, se obtuvieron 6 genotecas de unos 10.000 *tags* cada una (tabla 2)

Librería SAGE	Nº paciente	Muestra	Sensibilidad a Cisplatino in vitro	Tags secuenciados
SENS 1	2	Pieza quirúrgica	Sensible	9826
SENS 2	3	Pieza quirúrgica	Sensible	11398
SENS 3	11	Pieza quirúrgica	Sensible	11037
RES 1	1	Pieza quirúrgica	Resistente	9976
RES 2	6	Pieza quirúrgica	Resistente	12077
RES 3	20	Pieza quirúrgica	Resistente	9933

Tabla 2: Análisis SAGE.

Tras la obtención de las genotecas, se realizó el análisis de SAGE de las muestras correspondientes a los 6 tumores seleccionados, determinándose el número de *tags* o copias detectadas para cada gen en cada una de las muestras. Posteriormente, se agruparon las muestras en 2 grupos de acuerdo a su sensibilidad o resistencia a cisplatino en el estudio *in vitro*: un grupo formado por los tumores sensibles y otro grupo formado por los tumores resistentes. Se hizo el recuento del número de copias totales de cada gen para cada uno de los grupos, sumando los recuentos de cada una de las muestras pertenecientes a cada grupo.

Se analizaron los cambios en la expresión génica para cada gen entre los dos grupos de tumores previamente establecidos. Se observaron diferencias de expresión estadísticamente significativas en 153 genes. En la tabla (anexo 2) se muestran los 100 genes donde se hallaron las mayores diferencias de expresión entre el grupo de tumores sensibles y el grupo de tumores resistentes a cisplatino. A continuación, se seleccionaron los genes sobreexpresados en el grupo de tumores resistentes con respecto al grupo de tumores sensibles, así, se escogieron 95 genes (anexo 3). Sobre estos 95 genes, se realizó un estudio ontológico de rutas mediante el programa informático GeneMania (<http://www.genemania.org/>). El estudio mostró una importante interrelación de los genes seleccionados procedentes del estudio de SAGE (figura 6). También se encontró en dicho estudio un aumento significativo en genes pertenecientes a las rutas mostradas en la tabla 3.

Ruta / Proceso	p
Ruta de señalización de interferón tipo I	0.000003
Desarrollo epidérmico	0.00042
Filamentos intermedios del citoesqueleto	0.003
Señalización por citokinas	0.0052
Actividad oxidorreductasa	0.019

Tabla 3: Rutas halladas en el estudio GeneMania a partir de los genes SAGE.

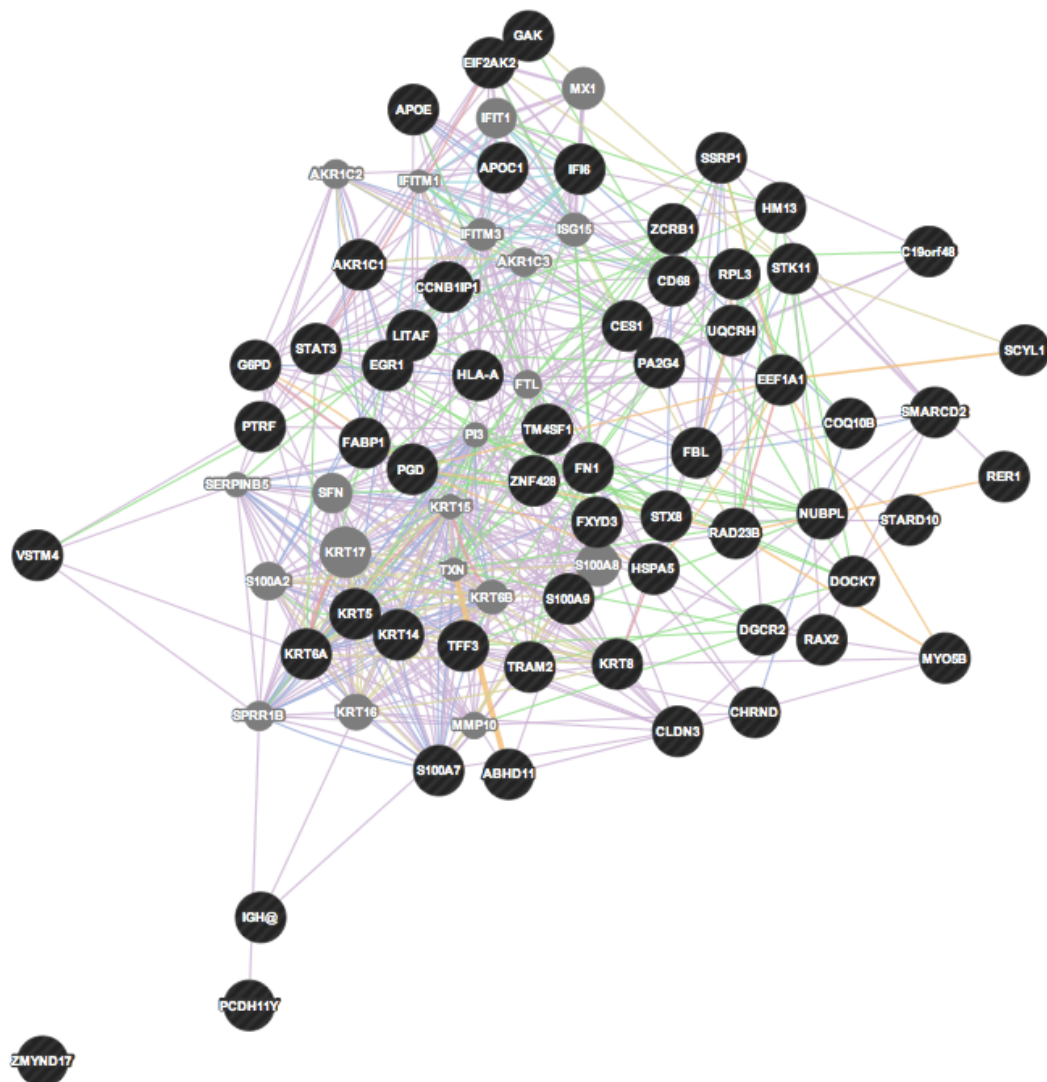


Figura 6: Estudio ontológico de rutas para los genes del estudio de SAGE (GeneMania)

Para la selección final de los genes que serían incluidos en las tarjetas de qPCR, se eligieron de entre estos 95 genes aquellos con diferencias más significativas de expresión en el análisis por grupos, y en los que además se hubiera evidenciado la sobreexpresión en cada uno de los tumores resistentes de forma individual. Finalmente se escogieron 6 genes de acuerdo a estos criterios, atendiendo además a su función y potencial relevancia biológica en el proceso estudiado. En la tabla 4 se presentan los genes seleccionados, su secuencia identificativa o *tag* correspondiente,

el número de veces que está representado el gen en cada grupo (sensibles vs resistentes), y el valor de p.

Gen	Nº copias en pool resistentes	Nº copias en pool sensibles	p	Secuencia tag	Descripción
CLDN3	15	6	0,00093	CTCGCGCTGG	Claudin 3
S100A9	34	8	<0,00001	GTGGCCACGG	S100 calcium binding protein A9
KRT14	5	1	0,025	GATGTGCACG	Keratin 14
HSPB1	7	0	0,0001	CCCAAGCTAG	Heat shock 27kDa protein 1
EGR1	5	1	0,025	GGATATGTGG	Early growth response 1
POU5F1	7	1	0,01	TATCACTTTT	POU class 5 homeobox 1

Tabla 4: Datos de expresión por SAGE de los 6 genes seleccionados.

3. CONFECCIÓN DE LAS TARJETAS DE qPCR:

Como ya se ha expuesto previamente, la selección de genes para el estudio mediante qPCR en la muestra de pacientes con CPNM avanzado se ha realizado atendiendo por una parte a los genes encontrados en el análisis de SAGE y por otro a genes procedentes de la revisión de la evidencia disponible.

Los genes seleccionados mediante el estudio de SAGE se muestran en la tabla 5:

Gen	Descripción
CLDN3	Claudin 3
S100A9	S100 calcium binding protein A9
KRT14	Keratin 14
HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1
EGR1	Early growth response 1
POU5F1	POU class 5 homeobox 1

Tabla 5: Genes seleccionados mediante el estudio SAGE (6 genes)

A este grupo de genes se añadieron los genes procedentes de la selección bibliográfica. Dichos genes fueron seleccionados por su potencial papel en la respuesta a quimioterapia y/o su valor pronóstico en CPNM evidenciado en la literatura. Los genes seleccionados se muestran en la tabla 6, donde además se ha añadido una referencia a la función que desempeñan y al posible rol en la predicción de pronóstico o de respuesta en CPNM.

Finalmente, se escogieron 3 genes normalizadores o *housekeeping*, empleados habitualmente en este tipo de estudio. Estos genes presentan una expresión constitutiva en todas las células, por lo que sus cambios se relacionan con la cantidad de ADN presente en la muestra. Los genes escogidos se muestran en la tabla 7.

Gen	Función	Papel potencial en el estudio	Descripción
ZEB1	Transición epitelio-mesénquima	Potencial metastático	Zinc finger E-box binding homeobox 1
TWIST1	Transición epitelio-mesénquima	Potencial metastático	Twist homolog 1
ERCC1	Reparación del ADN	Respuesta al tratamiento	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency
APEX1	Reparación del ADN	Respuesta al tratamiento	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
ATP7B	Flujo de cobre hepático a la bilis	Respuesta al tratamiento	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
AKT1	Señalización vía PI3K	Supervivencia y migración celular	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
HAT1	Mantenimiento estructura de la cromatina	Respuesta al tratamiento	Histone acetyltransferase 1
MYST1	Mantenimiento estructura de la cromatina	Respuesta al tratamiento	MYST histone acetyltransferase 1
GPX4	Reducción de peróxidos lipídicos	Respuesta al tratamiento	Glutathione peroxidase
ABCB1	Bomba de expulsión de fármacos	Respuesta al tratamiento	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1
FRAP1	Señalización vía PI3K	Supervivencia y migración celular	Mechanistic target of rapamycin

Tabla 6: Genes escogidos de la literatura (11 genes)

Gen	Descripción
ACTB	Actin, beta
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Tabla 7: Genes *housekeeping* (3 genes)

4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE qPCR EN PACIENTES CON CPNM AVANZADO:

4.1. Datos clínicos:

Se seleccionaron 65 pacientes candidatos para el estudio de acuerdo al cumplimiento de los criterios de inclusión y de exclusión del estudio y a la disponibilidad de suficiente material tisular para el procesamiento requerido en el estudio. Posteriormente se excluyeron del estudio 3 pacientes, debido a una insuficiente calidad o cantidad del ARN extraído de la muestra, que impedía su análisis mediante qPCR. La mediana de supervivencia libre de progresión de los pacientes reclutados fue de 8 meses (rango 6-10 meses) . La mediana de supervivencia global fue de 11 meses (rango de 7 a 15 meses) (figura 7).

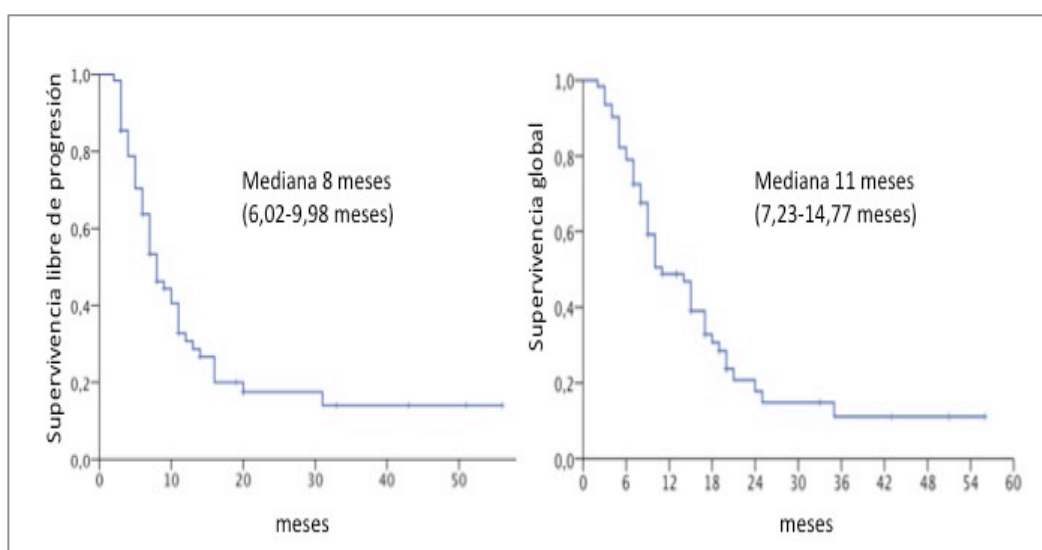


Figura 7: Supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha), todos los pacientes.

En la tabla 8 se resumen las características de los 62 pacientes con CPNM avanzado incluidos en el estudio. Todos los pacientes recibieron quimioterapia basada en derivados de platino como primera línea de tratamiento.

n		62
Edad		61 (42-80)
Sexo	Varones	56 (90,3%)
	Mujeres	6 (9,7%)
Tabaquismo	Fumadores	38 (61,3%)
	Paquetes/año	51 (12-120)
	No fumadores	6 (9,7%)
	No registrado	18 (29%)
ECOG	0-1	50 (80,7%)
	≥ 2	12 (19,3%)
Histología	Epidermoide	25 (40,3%)
	Adenocarcinoma	15 (24,2%)
	Células grandes	21 (33,9%)
Estadio	IIIB	13 (20,9%)
	IV	47 (75,8%)
	IIIA no operado	2 (3,2%)
Quimioterapia	Basada en Cisplatino	51 (82,2%)
	Basada en Carboplatino	11 (17,7%)
Nºciclos		5 (1-9)
Radioterapia	Sí	4 (6,5%)
	No	58 (93,5%)
Respuesta	Respuesta completa (RC)	2 (3,2%)
	Respuesta Parcial (RP)	25 (40,3%)
	Estabilización (EE)	12 (19,4%)
	RC+RP+EE	49 (62,9%)
	Progresión (PE)	23 (37,1%)

Tabla 8: Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

4.2. Análisis pronóstico en función de los factores clínico-patológicos al diagnóstico:

En el análisis univariante realizado para analizar la relación entre los factores clínico-patológicos de los pacientes al diagnóstico y el pronóstico observado en esta serie (SLP y SG), el estado general del paciente al inicio del tratamiento (medido según la escala ECOG) y el tipo histológico del tumor se asociaron estadísticamente a una mejora de la SLP y de la SG (figuras 8-12).

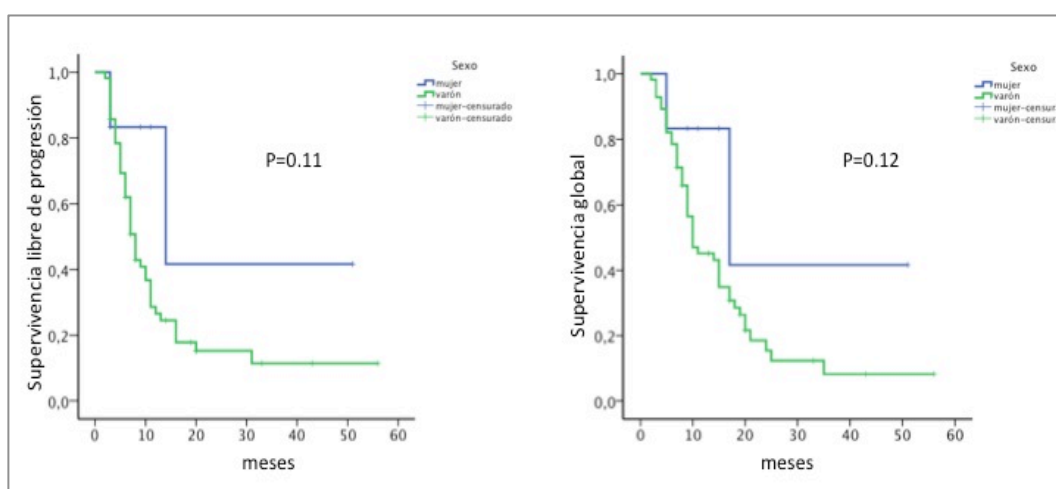


Figura 8: SLP (izquierda) y SG (derecha) en función del sexo del paciente.

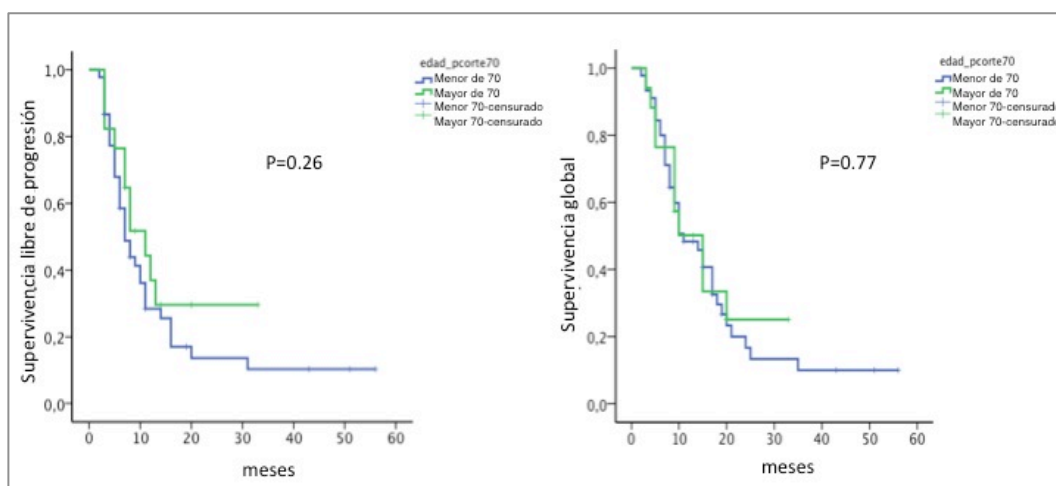


Figura 9: SLP (izquierda) y SG (derecha) en función de la edad del paciente (igual o mayor vs menor de 70 años)

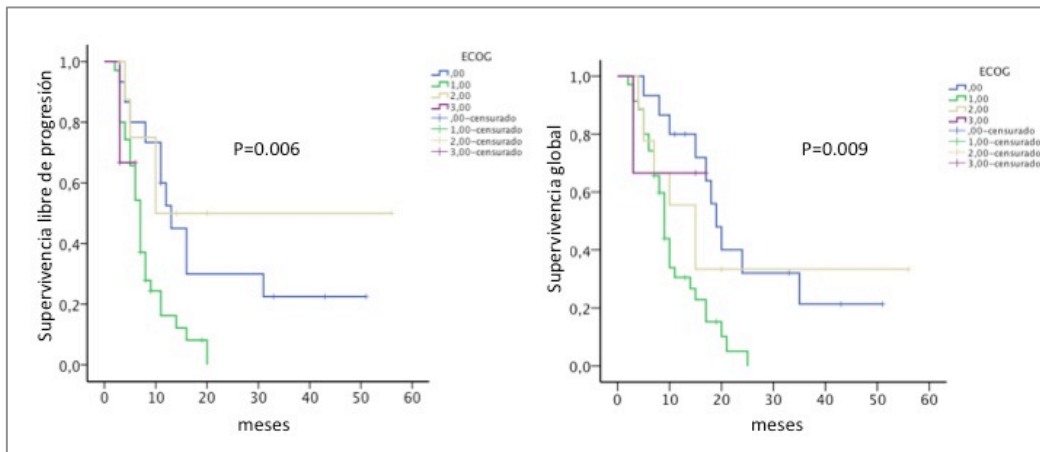


Figura 10: SLP (izquierda) y SG (derecha) en función del estado general del paciente (escala ECOG).

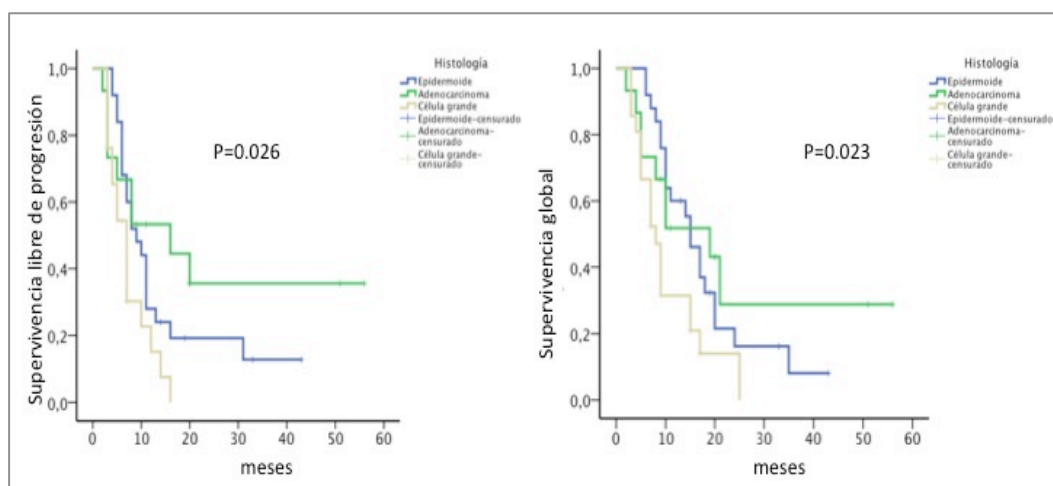


Figura 11: SLP (izquierda) y SG (derecha) en función del tipo histológico del tumor.

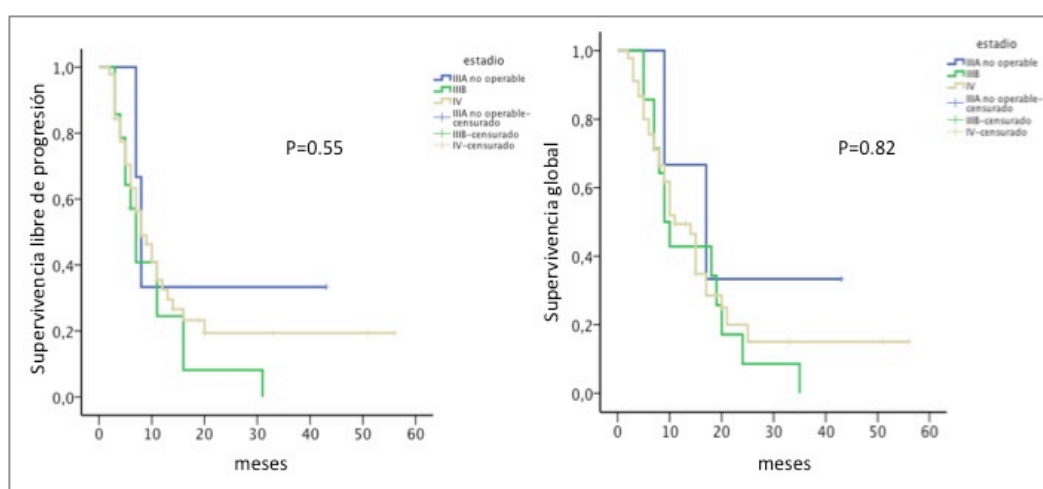


Figura 12: SLP (izquierda) y SG (derecha) en función del estadio tumoral.

En el análisis multivariante para SLP y SG en función de los factores clínico-patológicos al diagnóstico, el ECOG 1 fue el único factor que presentó una asociación con la SLP (ECOG 1 vs ECOG 0 HR 2.7 IC 95% 1.1-6.7). Para la SG, se observó asociación entre el ECOG 1 (ECOG 1 vs ECOG 0 HR 3.3 IC 95% 1.3-8.3) y la histología de células grandes (carcinoma células grandes vs carcinoma escamoso HR 2.1 IC 95% 1-4.4) (tablas 9 y 10).

Factor Pronóstico		HR	IC 95%	p
Sexo	Mujeres	1		
	Varones	3	0.7-13.3	0.15
Edad	<= 70	1		
	> 70	0.9	0.4-1.8	0.66
ECOG	0	1		
	1	2.7	1.1-6.7	0.03
	2	0.8	0.2-3.2	0.83
	3	1.7	0.2-14.6	0.65
Histología	Epidermoide	1		
	Adenocarcinoma	0.9	0.4-2.1	0.80
	Células grandes	1.7	0.8-3.6	0.14
Estadio	IIIA no operado	1		
	IIIB	1.4	0.4-5	0.64
	IV	0.9	0.3-3.3	0.89

Tabla 9: Análisis multivariante para SLP según factores clínico-patológicos al diagnóstico.

Factor Pronóstico		HR	IC 95%	p
Sexo	Mujeres	1		
	Varones	2.3	0.5-10.6	0.28
Edad	<= 70	1		
	> 70	1.1	0.5-2.3	0,82
ECOG	0	1		
	1	3.3	1.3-8.3	0.01
	2	1.7	0.5-6.2	0.41
	3	0.5	0.1-4.6	0.56
Histología	Epidermoide	1		
	Adenocarcinoma	0.9	0.4-2.3	0.91
	Células grandes	2,1	1-4.4	0.04
Estadio	IIIA no operado	1		
	IIIB	1.6	0.4-5.9	0,51
	IV	0.81	0.2-3	0.75

Tabla 10: Análisis multivariante para SG según factores clínico-patológicos al diagnóstico

4.3. Análisis pronóstico en función de la respuesta a quimioterapia basada en platino:

Se realizó un análisis de la SLP y de la SG de acuerdo a la respuesta observada tras 3 meses de tratamiento con una primera línea de quimioterapia basada en platino, agrupando aquellos pacientes que mostraron respuesta completa, parcial o estabilización de la enfermedad frente a aquellos que mostraron progresión de la misma. La presencia de respuesta/estabilización de la enfermedad se asoció estadísticamente a una mejora de la SLP y de la SG (figura 13).

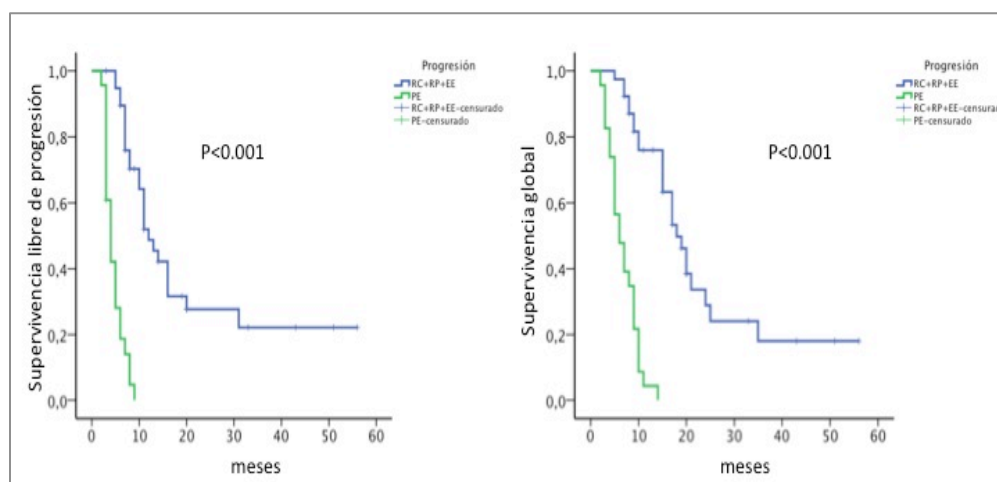


Figura 13: SLP (izquierda) y SG (derecha) en función de la respuesta a quimioterapia basada en platino (respuesta / estabilización vs progresión).

4.4. Análisis de la expresión génica mediante qPCR:

Se analizó la expresión de los 17 genes escogidos mediante qPCR sobre tarjetas microfluídicas. Los datos de expresión se normalizaron frente al gen housekeeping ACTB. Los datos de expresión se muestran en la tabla 11.

Gen	n	media	desv. Típica
ABCB1	62	7,53	2,5
AKT1	62	3,02	0,95
APEX1	62	4,95	1,01
ATP7B	62	8,51	2,19
CLDN3	62	2,64	2,32
EGR1	62	2,56	1,72
ERCC1	62	2,3	1,18
FRAP1	62	5,41	1,34
GPX4	62	1,72	0,95
HAT1	62	7,05	1,77
HSPB1	62	0,65	1,15
KRT14	62	5,12	4,34
MYST1	62	3,45	1,47
POU5F1	62	6,11	1,67
S100A9	62	2,74	2,22
TWIST1	62	6,17	2,23
ZEB1	62	4,31	1,29

Tabla 11: datos de expresión génica por qPCR de los 17 genes normalizados frente a ACTB

4.5. Establecimiento de un perfil pronóstico basado en la expresión génica:

Se realizó en primer lugar un análisis univariante empleando el modelo de regresión de Cox para analizar la relación entre la supervivencia y los niveles de expresión de cada uno de los genes explorados. De los 17 genes, sólo la expresión de EGR1 presentó una asociación significativa con la SLP y la SG. Otros 4 genes (AKT1, APEX1, ERCC1, KRT14 y HSPB1) presentaron una tendencia cercana a la significación estadística ($p \leq 0.15$) para la asociación con la SLP o la SG (tabla 12)

Gen	SLP			SG		
	p	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%
ABCB1	0,49	0,91	0,69-1,19	0,803	0,966	0,73-1,26
AKT1	<u>0,10</u>	1,29	0,94-1,74	0,342	1,145	0,86-1,51
APEX1	<u>0,07</u>	1,33	0,97-1,81	<u>0,059</u>	1,352	0,98-1,85
ATP7B	0,23	0,86	0,66-1,10	0,39	0,895	0,69-1,15
CLDN3	0,72	0,95	0,71-1,26	0,673	0,941	0,70-1,24
EGR1	<u>0,02</u>	1,46	1,05-2,02	<u>0,079</u>	1,336	0,96-1,84
ERCC1	<u>0,15</u>	0,79	0,57-1,09	<u>0,064</u>	0,741	0,53-1,01
FRAP1	0,46	1,12	0,82-1,52	0,574	1,089	0,80-1,46
GPX4	0,25	0,83	0,6-1,14	0,312	0,85	0,61-1,16
HAT1	0,93	1,01	0,77-1,32	0,991	1,001	0,77-1,29
HSPB1	0,32	1,17	0,86-1,58	<u>0,095</u>	1,282	0,95-1,71
KRT14	<u>0,11</u>	0,79	0,59-1,05	<u>0,143</u>	0,801	0,59-1,07
MYST1	0,29	0,85	0,62-1,14	0,242	0,841	0,62-1,12
POU5F1	0,55	0,92	0,69-1,21	0,514	0,909	0,68-1,20
S100A9	0,49	0,90	0,67-1,20	0,398	0,879	0,65-1,18
TWIST1	0,27	1,17	0,88-1,55	0,529	1,098	0,82-1,46
ZEB1	0,48	0,90	0,68-1,20	0,587	0,922	0,68-1,23

Tabla 12: análisis univariante de la SLP y la SG según los niveles de expresión génica.

Posteriormente se realizó un análisis multivariante aplicando la regresión de Cox por pasos hacia delante e incluyendo los 6 genes previamente seleccionados (AKT1, APEX 1, EGR1, ERCC1, HSPB1 y KRT14). Sólo EGR1 y ERCC1 mantuvieron su valor pronóstico independiente para la SLP. Así, se obtuvo un modelo pronóstico basado en la expresión de dos genes: EGR1, cuyo aumento en la expresión se relacionaba significativamente con peor pronóstico y mayor probabilidad de progresión (HR 1.60; 1.14-2.25 IC 95%) y ERCC1, cuyo aumento en la expresión se asociaba con un mejor pronóstico y una menor probabilidad de progresión de los pacientes (HR 0.7; 0.49-0.98 IC 95%) (tabla 13).

	HR	IC 95%	P
EGR1	1,6	1,14-2,25	0,023
ERCC1	0,7	0,49-0,98	0,039

Tabla 13: Perfil pronóstico de 2 genes

El modelo pronóstico generado a partir de la regresión de Cox se basa en la siguiente fórmula:

$$\text{Score pronóstico} = 0.472 * \text{EGR1} + (-0,356 * \text{ERCC1})$$

Una vez obtenida la puntuación del *score* o puntuación pronóstica en cada uno de los pacientes estudiados, se separaron los pacientes en dos grupos de acuerdo a la mediana de las puntuaciones obtenidas. El análisis de supervivencia mostró que ambos grupos presentaban diferencias estadísticamente significativas tanto en SLP como en SG (tabla 14 y figura 12).

puntuación <i>score</i>	SLP			SG		
	Mediana (meses)	IC 95%	p (Log- Rank)	Mediana (meses)	IC 95%	p (Log- Rank)
≤ 0.0036	11	7,5 - 14,4	0,011	15	8,9 - 21	0,015
> 0.0036	7	4,7 - 9,2		10	8,9 - 11	

Tabla 14: SLP y SG de acuerdo a la puntuación *score* (grupos divididos por la mediana)

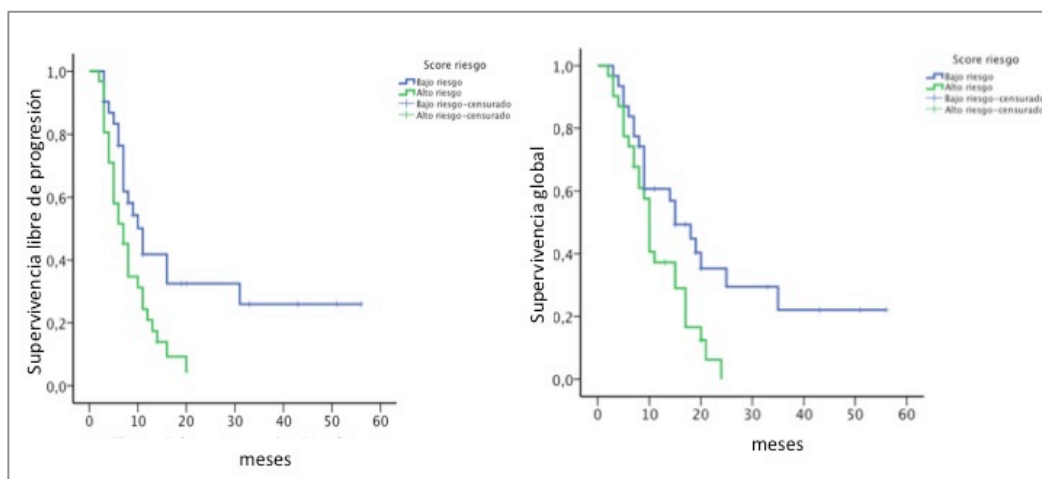


Figura 14: SLP (izquierda) y SG (derecha) de acuerdo a los grupos de riesgo establecidos por la puntuación *score*.

En el análisis multivariante para SLE y SG, el *score* pronóstico junto con el ECOG1 y la histología de células grandes mantuvieron su valor pronóstico independiente cuando se ajustaba por los factores clínico-patológicos que habían mostrado impacto pronóstico en nuestra serie (tablas 15 y 16).

Factor Pronóstico		HR	IC 95%	p
ECOG	0	1		
	1	2.46	1.16-5.22	0.019
	2	0.77	0.24-2.50	0.660
	3	2.79	0.31-25.36	0.363
Histología	Epidermoide	1		
	Adenocarcinoma	0.67	0.29-1.53	0.346
	Células grandes	1.43	0.72-2.83	0.305
puntuación score	<= 0.0036	1		
	> 0.0036	2	1.08-3.71	0.026

Tabla 15: Análisis multivariante para SLP según factores clínico-patológicos al diagnóstico y puntuación score

Factor Pronóstico		HR	IC 95%	p
ECOG	0	1		
	1	2.62	1.20-5.69	0.015
	2	1.52	0.52-4.46	0.449
	3	0.76	0.09-6.70	0.804
Histología	Epidermoide	1		
	Adenocarcinoma	0.77	0.33-1.79	0.543
	Células grandes	1.99	1-3.97	0.048
puntuación score	<= 0.0036	1		
	> 0.0036	2.04	1.08-3.83	0.026

Tabla 16: Análisis multivariante para SG según factores clínico-patológicos al diagnóstico y puntuación score.

4.6. Análisis de la expresión génica en relación con la respuesta a tratamiento:

Se realizó una comparación de las medias de los niveles de expresión de cada gen según la respuesta a quimioterapia (respuesta o estabilización vs progresión de la enfermedad). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de APEX1 y HAT1 entre los grupos determinados por la respuesta a quimioterapia. FRAP1 mostró niveles de expresión con una tendencia cercana a la significación estadística ($p=0,13$) entre los dos grupos de pacientes (tabla 17).

		media	Desv. Típica	p
ABCB1	RC+RP+EE	7,5293	2,85214	0,99
	PE	7,5283	1,80902	
AKT1	RC+RP+EE	2,9871	1,04945	0,75
	PE	3,0685	0,77555	
APEX1	RC+RP+EE	4,7387	1,09153	<u>0,03</u>
	PE	5,3196	0,75459	
ATP7B	RC+RP+EE	8,6347	2,44382	0,56
	PE	8,2938	1,72223	
CLDN3	RC+RP+EE	2,8409	2,37993	0,38
	PE	2,3041	2,23528	
EGR1	RC+RP+EE	2,5606	1,7442	0,99
	PE	2,5552	1,7042	
ERCC1	RC+RP+EE	2,4294	1,17391	0,26
	PE	2,078	1,17161	
FRAP1	RC+RP+EE	5,2135	1,36535	<u>0,13</u>
	PE	5,7524	1,25634	
GPX4	RC+RP+EE	1,8065	0,94166	0,33
	PE	1,5655	0,96603	
HAT1	RC+RP+EE	6,6926	1,87519	<u>0,03</u>
	PE	7,6648	1,40746	
HSPB1	RC+RP+EE	0,5673	1,13775	0,46
	PE	0,7906	1,17848	
KRT14	RC+RP+EE	5,3692	4,95506	0,51
	PE	4,692	3,07891	
MYST1	RC+RP+EE	3,5643	1,44862	0,42
	PE	3,2516	1,51158	
POU5F1	RC+RP+EE	6,134	1,73905	0,88
	PE	6,0666	1,59623	
S100A9	RC+RP+EE	2,7768	2,4869	0,86
	PE	2,6715	1,73896	
TWIST1	RC+RP+EE	5,8899	2,23591	0,20
	PE	6,6417	2,18935	
ZEB1	RC+RP+EE	4,3955	1,38977	0,48
	PE	4,1546	1,11589	

Tabla 17: análisis univariante para la respuesta a quimioterapia según los niveles de expresión génica (17 genes).

Posteriormente se realizó un análisis multivariante incluyendo los 3 genes previamente seleccionados (APEX 1, HAT1 y FRAP1). Ninguno de los genes mantuvo su valor independiente para la predicción de respuesta a platino (tabla 18).

	HR	IC 95%	p
APEX1	0,97	0,46-2,02	0,94
HAT1	1,07	0,75-1,51	0,72
FRAP1	0,88	0,51-1,52	0,64

Tabla 18: Análisis multivariante (regresión logística) para la respuesta a quimioterapia según la expresión de los genes seleccionados

También se exploró la capacidad predictiva de respuesta a platino del perfil basado en la expresión de EGR1 y ERCC1. El *score* generado presentó una sensibilidad del 56.4% y una especificidad del 60.9%, parámetros inferiores a los mínimos requeridos para considerar adecuada la capacidad clasificadora de un test (datos no mostrados).

Discusión

En este trabajo se ha empleado una estrategia novedosa para la selección de genes con potencial valor pronóstico y/o predictivo de respuesta a tratamiento en CPNM: por una parte se ha realizado un estudio no dirigido del transcriptoma mediante SAGE con el fin de identificar nuevos genes con valor en este contexto, y por otro se han seleccionado genes cuya relación con el pronóstico o la respuesta a tratamiento se ha evidenciado en la bibliografía disponible. El análisis de expresión de estos genes seleccionados en una muestra de pacientes con CPNM avanzado ha permitido establecer un perfil génico con valor pronóstico basado en la expresión de dos genes: EGR1, seleccionado desde el estudio de SAGE; y ERCC1, uno de los genes escogidos desde la literatura.

La discusión se estructura en tres partes de acuerdo a la presentación de resultados. En primer lugar abordaremos los estudios de sensibilidad a platino en tumores primarios de pulmón y el estudio de SAGE. Posteriormente analizaremos la implicación en CPNM de los genes seleccionados para la construcción de las tarjetas de qPCR. Finalmente, nos centraremos en el estudio sobre la serie de pacientes con CPNM avanzado y en la obtención de un perfil pronóstico basado en la expresión génica.

1. Estudios *in vitro* de sensibilidad a cisplatino y análisis SAGE:

Además de los factores pronósticos clínico-patológicos clásicos en CPNM, uno de los principales determinantes de la supervivencia en pacientes con CPNM avanzado es la respuesta al tratamiento quimioterápico, de hecho se ha demostrado su valor pronóstico independiente en este escenario (23). En nuestro estudio, consideramos que la expresión génica diferencial entre tumores sensibles y resistentes al tratamiento con quimioterapia podría guiar la búsqueda de genes con valor pronóstico y predictivo de respuesta en los pacientes. Con este fin, realizamos un estudio *in vitro* de sensibilidad a cisplatino sobre muestras de tumores primarios disgregadas y sometidas a concentraciones crecientes del fármaco, y posteriormente seleccionamos las muestras con un perfil más acusado de sensibilidad o resistencia al fármaco para realizar el estudio SAGE.

La elección de tumores primarios como muestras de partida para los estudios de sensibilidad a cisplatino se realizó para obtener una mayor representatividad clínica de nuestros resultados. Tradicionalmente, la investigación básica y preclínica en cáncer ha descansado sobre los estudios *in vitro* con líneas celulares tumorales. Las ventajas de las líneas celulares tumorales es su fácil accesibilidad y su adecuada caracterización molecular, que permite la comparabilidad entre estudios similares (231). Sin embargo, existen diferencias en las alteraciones genómicas presentes en estas líneas celulares comerciales y los tumores de los que proceden, que podrían limitar la aplicabilidad clínica de los resultados obtenidos mediante este tipo de estudios. Pan y colaboradores realizaron un análisis comparativo de la expresión proteica mediante SILAC entre hepatocitos primarios y la línea celular comercializada Hepa1-6 de hepatocitos inmortalizados. Aunque ambos proteomas se solapaban en el tipo de proteínas encontradas, las cantidades de cada una de las proteínas diferían de forma importante. Se encontraron mayores niveles de proteínas relacionadas con la división celular (ciclo celular, síntesis de ADN y polimerasa de ARN) en la línea celular, sin embargo las proteínas de la familia del citocromo P450 y otras enzimas del metabolismo de fármacos se encontraron infraexpresadas en la línea celular a un nivel hasta 10 veces inferior al de los hepatocitos primarios (232). Otro trabajo similar mostró la elevada frecuencia de mutaciones del gen p53 en líneas celulares de leucemia y linfoma con respecto a las presentes en tumores hemopoyéticos primarios, lo que sugiere que el establecimiento de líneas celulares procedentes de neoplasias es más fácil si la neoplasia presenta esa mutación (233). Teniendo en cuenta que la orientación posterior de este estudio era la realización de un análisis no dirigido de la expresión génica para el descubrimiento de genes con valor pronóstico y predictivo en clínica, consideramos que el estudio de tumores primarios de pacientes, factible en nuestro entorno gracias a la cooperación y a la integración de los Servicios Hospitalarios con las Unidades de Investigación Traslacional, aportaría un valor informativo mayor con respecto al estudio sobre líneas celulares, tal y como se ha descrito en estudios previos(234).

En el estudio de sensibilidad a cisplatino sobre 20 muestras de CPNM, se obtuvieron porcentajes de respuesta a cisplatino levemente elevados con respecto a los observados en pacientes, cuyo porcentaje de respuesta se encuentra en torno al 20-30%. (235). Al tratarse de muestras procedentes de pacientes intervenidos

quirúrgicamente, no es posible correlacionar en los tumores analizados la respuesta clínica a quimioterapia con la respuesta observada en el estudio *in vitro* de sensibilidad. No obstante, es frecuente observar porcentajes de respuesta más elevados en los estudios *in vitro* con respecto a los porcentajes observados en pacientes. Fiebig y colaboradores compararon la respuesta a distintos quimioterápicos observada en pacientes con la sensibilidad a los mismos fármacos observada en estudios *in vitro* (ensayos clonogénicos) con células procedentes del tumor del paciente o en estudios *in vivo* sobre animales xenoinjertados con tejido tumoral del paciente. La mayor concordancia de respuesta se obtuvo con el modelo animal. La comparación entre la respuesta clínica y el modelo de crecimiento *in vitro* obtuvo unos porcentajes de concordancia en la predicción de sensibilidad del 62% y del 92% para la predicción de resistencia a los fármacos(236). Por todo esto, podemos considerar que los datos obtenidos en el estudio de sensibilidad son fiables y representativos del comportamiento clínico de estos tumores.

En nuestro estudio hemos analizado mediante SAGE la expresión génica de 6 muestras de CPNM seleccionadas de acuerdo a su sensibilidad o resistencia a cisplatino en el estudio previo de sensibilidad. Como se ha mencionado previamente, la principal ventaja de la técnica de SAGE con respecto a la técnica de *microarrays* es la posibilidad de obtener datos cuantitativos precisos del “total” de genes expresados en una muestra, sin limitaciones inherentes a la elección de genes de antemano. Ello permite el descubrimiento e identificación de nuevos genes no propuestos hasta la fecha y que pueden tener un valor informativo específico en el proceso estudiado (228). Una de las principales limitaciones de la técnica de SAGE es su elevada laboriosidad y complejidad. Por ello, no es posible aplicarla a un número elevado de muestras, por lo que se han de escoger los casos con mayor interés en el análisis. En nuestro estudio, hemos escogido los fenotipos más extremos de sensibilidad o resistencia, con el fin de detectar las mayores diferencias de expresión en genes relevantes en el análisis comparativo.

Como criterio inicial para la selección génica a partir del estudio de SAGE se ha asumido un cambio significativo ($p < 0.05$) en el número de copias del gen entre el grupo de tumores sensibles y el grupo de tumores resistentes. El segundo criterio de selección, basado en la sobreexpresión significativa en el grupo de tumores

resistentes a platino, obedece a un concepto más orientado al tratamiento de la enfermedad. Las aberraciones de expresión génica que se traducen en ganancia de función son más fácilmente abordables desde el punto de vista terapéutico que la restauración de la pérdida de función de un determinado gen o proteína. De hecho, la mayor parte de las terapias dirigidas empleadas actualmente en oncología se han desarrollado sobre esta base (237).

Antes de realizar la selección definitiva de genes que formarían parte de las tarjetas de qPCR, hemos realizado un análisis génico ontológico sobre los genes sobreexpresados en condiciones de resistencia a cisplatino, con el fin de analizar el grado de interrelación de los genes y explorar posibles rutas en las que podrían estar implicados. Se han identificado 5 rutas principales en torno a las que se agrupan los genes hallados en este estudio:

- La ruta de señalización mediada por interferón tipo I forma parte de los mecanismos generales de respuesta del sistema inmune. Varias de las proteínas que se activan mediante la señalización por interferones tipo I se han relacionado con la resistencia a cisplatino, tales como JAK-STAT (238) , la MAP kinasa p38 (181) o la ruta de PI3K (174), algunas de las cuales ya han sido expuestas en la introducción de este trabajo.
- Los genes que se agrupan en las categorías de desarrollo epidérmico y de filamentos intermedios del citoesqueleto, están representados por las citoqueratinas 5, 6A, 6C, 8 y 14, propias de los tumores de estirpe epitelial, que se han encontrado sobreexpresadas en los tumores resistentes a cisplatino en nuestro estudio; y las proteínas con dominios de unión a calcio S100A7, S100A9, y S100A14 que se relacionan con procesos tales como el crecimiento y la diferenciación celular, la dinámica del citoesqueleto, la inflamación o la homeostasis del calcio. La sobreexpresión de citoqueratina 14 y S100A7 se han relacionado con mal pronóstico en CPNM (239) , (240), mientras que la sobreexpresión de S100A9 se ha relacionado también con la resistencia al tratamiento (ver siguiente apartado).
- El grupo de vías de señalización de citoquinas comprende varios genes como S100A7, S100A9, STAT3, HLA-A o EGR1, que forman parte de los mecanismos generales de transmisión intracelular de señales implicadas en progresión tumoral o respuesta a tratamiento. La importancia de EGR1, factor de transcripción

implicado en la respuesta de crecimiento temprana, se discutirá en detalle en el apartado relativo al modelo pronóstico basado en la expresión génica.

- Los genes relacionados con la actividad oxidorreductasa, están representados por GPX2 y GPX4 en nuestro estudio. Esta actividad está implicada en los procesos de reparación del daño oxidativo y en la respuesta inflamatoria mediante su actividad reguladora del metabolismo de los leucotrienos. La relación de esta vía con el desarrollo de cáncer o la respuesta a los tratamientos ha sido poco estudiada, si bien algunas evidencias sugieren un potencial papel en la regulación del ciclo celular y en la carcinogénesis mediante su interrelación con las vías de COX-2 y la lipooxigenasa 12/15. El tratamiento con cisplatino induce la generación de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido, que desencadenan la apoptosis celular. La sobreexpresión de las proteínas implicadas en este sistema de detoxificación podría estar implicada en la resistencia a este compuesto (241).

Las rutas encontradas mediante este estudio ontogénico, algunas poco exploradas en relación con las respuesta a cisplatino o el pronóstico en CPNM, han sido tenidas en cuenta en la posterior selección de genes para la inclusión en las tarjetas de qPCR. Algunos genes de estas rutas han sido seleccionados tras completar el cribado de los genes SAGE, mientras que otros genes procedentes de la selección bibliográfica también atienden a un propósito exploratorio de las rutas encontradas, como se explicará en el siguiente apartado.

2. Selección génica para la confección de las tarjetas de qPCR

En nuestro estudio, la selección de los genes cuya expresión sería valorada posteriormente mediante qPCR se realizó a partir de dos fuentes: por una parte el análisis SAGE de las muestras con sensibilidad o resistencia conocidas a cisplatino, y por otro, la selección de genes con relevancia pronóstica y/o predictiva en CPNM de acuerdo a la bibliografía existente. Esta estrategia se orienta al objetivo de complementar la información de genes con valor conocido en este ámbito con la información proveniente de genes no propuestos hasta la fecha y que en el estudio SAGE han mostrado diferencias significativas entre tumores sensibles y resistentes a platino. La incorporación de genes procedentes de la bibliografía obedece al propósito

de obtener un perfil válido y aplicable a un mayor número de tumores, ya que existe la posibilidad de que las diferencias de expresión génica encontradas en el análisis SAGE, por proceder de un número muy reducido de muestras, no pudieran ser aplicables con posterioridad sobre otras series. La selección bibliográfica también se ha orientado a representar varias de las rutas obtenidas en el estudio ontológico a partir de los genes SAGE, con el fin de explorar su valor en pronóstico o predicción de respuesta.

En la tabla 19 se muestran los genes seleccionados para confeccionar las tarjetas de qPCR procedentes del estudio de SAGE, la función general en la que están implicados y la evidencia disponible de su papel en CPNM. Los criterios para la elección de los genes procedentes del estudio de SAGE se han expuesto con detalle en el apartado de material y métodos, y atienden fundamentalmente a las diferencias de expresión entre tumores sensibles y resistentes, seleccionando los genes finales entre aquellos sobreexpresados en los tumores resistentes. No obstante, hemos podido hallar diversas referencias, algunas publicadas con fechas posteriores a esta selección, que evidencian el papel pronóstico y predictivo de respuesta en CPNM de algunos de los genes seleccionados mediante esta técnica en nuestro estudio. Sólo en el caso de CLDN3, los trabajos publicados en CPNM arrojan resultados no concluyentes u opuestos a los hallados en nuestro trabajo. Por otra parte, uno de los aspectos que consideramos más llamativos en este estudio es que genes tales como ERCC1 o MDR1, ampliamente estudiados como encrucijadas centrales de los mecanismos de resistencia a platino, no han mostrado una expresión diferencial en el análisis SAGE entre tumores sensibles y resistentes a este fármaco. Las publicaciones que revisaremos a continuación contribuyen por tanto a reforzar la validez del estudio no cribado del transcriptoma para el descubrimiento de nuevos genes candidatos en la predicción pronóstica y predictiva de respuesta en CPNM.

Gen	UniGene	Nombre	Función	Papel propuesto en CPNM
CLDN3	Hs.25640	Claudin-3	Proteínas de membrana	Relación negativa con invasividad in vitro (242). Diferente expresión según subtipo histológico-preferencialmente en adenocarcinoma- (243, 244)
S100A9	Hs.112405	S100 calcium binding protein A9	Respuesta inmune	Sobreexpresión asociada a mal pronóstico (245). Probable relación con quimiorresistencia y metástasis (246) y supresión respuesta inmune (247).
KRT14	Hs.355214	Keratin-14	Función estructural	Sobreexpresión relacionada con mal pronóstico (239), posible papel en la carcinogénesis pulmonar (248).
HSPB1	Hs.520973	Heat shock 27kDa protein 1	Respuesta a estrés	Sobreexpresión en tejido tumoral (249), marcador precoz CPNP escamoso (250). Polimorfismos predictores de peor pronóstico tras quimio-radioterapia (251). Niveles expresión relacionados con el estadio clínico (252). Polimorfismos relacionados con riesgo y supervivencia en CPNM (253)(5)
EGR1	Hs.326035	Early growth response 1	Ciclo celular y diferenciación	Niveles bajos de expresión relacionados con mal pronóstico (254). Proangiogénico vía VEGF-A, bFGF y PDGF (255)(256).
POU5F1	Hs.249184	POU class 5 homeobox 1	Renovación células madre	Niveles altos de expresión asociados a inferior SLE y SG en adenocarcinoma (257)(258) y carcinoma escamoso (259) Implicado en transición epitelio-mesénquima, resistencia a cisplatino y adquisición fenotipo <i>stem</i> (260)(261)(262)

Tabla 19: Genes seleccionados para qPCR procedentes de SAGE y valor en CPNM.

- En el caso de **S100A9**, un trabajo reciente de Acharyya y colaboradores describe el papel de esta proteína en la señalización paracrina entre el tumor, las células endoteliales y las células mieloides que favorecen la supervivencia tumoral en cáncer

de mama. Un interesante hallazgo es que la quimioterapia genera una reacción estromal en el lecho tumoral que potencia la señalización mediada por S100A9 vía aumento de TNF alfa, provocando quimiorresistencia (246). Del mismo modo, en CPNM Srivastava y colaboradores han descrito el papel de S100A9 como factor inmunosupresor mediante el reclutamiento de células supresoras mieloides en el estroma tumoral (247). Por último, Kawai y colaboradores han analizado el valor pronóstico de la expresión de S100A9 en 70 muestras de CPNM, encontrando que los pacientes cuyos tumores sobreexpresaban dicha proteína, presentaban una menor SG que aquellos cuyos tumores la expresaban débilmente o no la expresaban. La sobreexpresión de S100A9 se comportó como un factor pronóstico independiente para la SG en este estudio (245).

-La sobreexpresión de **KRT14** se ha correlacionado con la aparición de lesiones premalignas y la diferenciación hacia CPNM escamoso, tal y como han mostrado estudios sobre modelos murinos (248). Posteriormente, se ha descrito que la presencia de una subpoblación de células progenitoras positivas para Krt14 relacionadas con la reparación del daño en la vía aérea en pacientes con CPNM predice peor pronóstico en estos pacientes, particularmente en fumadores (239).

- El gen **HSPB1** codifica para la proteína Hsp27, implicada en la respuesta a estrés celular. Los estudios que correlacionan Hsp27 con pronóstico y respuesta a quimioterapia muestran resultados no concluyentes. La elevación de los niveles de esta proteína en suero distingue a los pacientes afectados por CPNM de individuos sanos o con EPOC, y en el grupo de pacientes con CPNM se correlaciona con el estadio clínico de los tumores, siendo mayor la expresión en los tumores avanzados (252). Sin embargo, en otro estudio, la expresión de Hsp27 se ha relacionado con una mayor supervivencia en pacientes con CPNM operado, mientras que su ausencia se asocia a un pronóstico ominoso (263). En cuanto a la respuesta al tratamiento, un estudio ha mostrado una tendencia no significativa a la progresión y resistencia al tratamiento con vinorelbina en tumores pulmonares Hsp27 positivos (264). Sin embargo, un estudio sobre líneas celulares de cáncer de mama relaciona la represión de la expresión de Hsp27 con la inducción de la expresión del gen MDR1, gen implicado en la resistencia a distintos quimioterápicos, entre ellos el cisplatino (265).

- El gen **EGR1** es un factor de transcripción con efecto proangiogénico tumoral. Este gen desencadena la expresión de VEGF-A y también activa la expresión de FGF y PDGF (256). Su valor clínico en CPNM no se ha determinado: un estudio muestra que la sobreexpresión de este factor se relaciona con un mejor pronóstico de los pacientes (254) , mientras que otro estudio concluye con la relación inversa (255). Expondremos en profundidad los estudios relativos a este gen en el apartado del modelo pronóstico basado en la expresión génica.

- **POU5F1** (Oct-4), es un gen relacionado con la desdiferenciación y la adquisición de un fenotipo propio de las células madre tumorales. Un estudio sobre 64 muestras tumorales de pacientes con adenocarcinoma de pulmón evidenció que su expresión se relacionaba con intervalos libres de enfermedad más cortos (258) , y otro estudio sobre 113 muestras de CPNM mostró una asociación entre la sobreexpresión de POU5F1 y una menor supervivencia global tanto en CPNM escamoso como en adenocarcinoma (259) . Estudios *in vitro* sobre la adquisición de resistencia a platino muestran la aparición en este contexto de un subtipo de células en la población tumoral con fenotipo “célula madre” o *stem*, caracterizado por la sobreexpresión de POU5F1, así como otros factores implicados en la transición epitelio-mesénquima (262).)

Para la selección de los genes procedentes de la bibliografía, se consideraron los mecanismos moleculares implicados en el pronóstico y respuesta al tratamiento del cáncer de pulmón. Además, se tuvo en cuenta el resultado del estudio ontológico de rutas realizado sobre los genes sobreexpresados en tumores resistentes a cisplatino en el estudio SAGE. Con el objeto de descubrir nuevos genes, nuestra selección no se ciñó sólo a los candidatos clásicos implicados en la respuesta a cisplatino sino que se abrió al estudio de nuevos genes con potencial implicación en pronóstico o respuesta a quimioterapia en CPNM.

Como mecanismos clásicos implicados en predicción de respuesta a platino se consideraron las rutas de reparación del ADN, la ruta de PI3K y las proteínas de resistencia múltiple a drogas. Estos mecanismos y rutas, ya revisados en la

introducción de este trabajo, han sido extensamente estudiados como mediadores de quimiorresistencia a cisplatino en CPNM, y también como potenciales marcadores pronósticos. En representación de dichos procesos y rutas, se escogieron los genes ERCC1, AKT, FRAP1 (MTOR) y MDR1. Además, se exploraron mecanismos adicionales del control de la integridad y reparación del ADN incluyendo a los genes HAT1, APEX1 y MYST1, que también han sido relacionados con resistencia a cisplatino, y otras proteínas de membrana con una potencial implicación en la resistencia a este compuesto, como el transportador de membrana ATP7B (266).

Los procesos de transición epitelio-mesénquima han cobrado gran interés por su implicación en la progresión y diseminación metastásica de los tumores. Por ello, se incluyó la pareja de genes ZEB1 y TWIST1. Ambos genes se han implicado ampliamente en los procesos de metástasis del cáncer (290) (291). TWIST1 es un factor de transcripción que se ha implicado en la transición epitelio mesénquima mediante la regulación positiva de las metaloproteinasas de la matriz (292) y también en la resistencia a cisplatino en la evasión de la apoptosis (273). Nuestro grupo, además, definió el potencial valor de este gen en la carcinogénesis colorrectal (293). Estudios posteriores han evidenciado la relación entre la sobreexpresión de TWIST1 y el empeoramiento pronóstico en CPNM (269)(270)(271)

Finalmente, en el estudio ontológico realizado con los genes sobreexpresados en los tumores resistentes procedentes del estudio de SAGE, nos pareció especialmente relevante la sobrerrepresentación de los mecanismos de control del estrés oxidativo. Por este motivo, se incluyó el gen GPx4 que tiene como función la reducción de los hidroperóxidos lipídicos, estos compuestos tienen gran importancia en el control de la apoptosis(294).

En la tabla 20 se muestran los genes seleccionados a partir del estudio bibliográfico, su función y la evidencia disponible de su papel en CPNM.

Gen	UniGene	Nombre	Función	Papel propuesto en CPNM
ZEB1	Hs.124503	zinc finger E-box binding homeobox 1	Transición epitelio-mesénquima	Implicado en resistencia a docetaxel in vitro,(267), invasividad y metástasis (268)
TWIST1	Hs.66744	twist homolog 1	Transición epitelio-mesénquima	Sobreexpresión relacionada con menor supervivencia global y libre de enfermedad(269)(270)(271) Posible papel en resistencia a cisplatino (272)(273)
ERCC1	Hs.435981	excision repair cross-complementing group-1	Reparación ADN	Niveles de expresión / ciertos polimorfismos relacionados con pronóstico y respuesta a platino en CPNM (274)(275)(276)(87)
APEX1	Hs.73722	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	Reparación ADN	Niveles altos de expresión relacionados con resistencia a cisplatino y mal pronóstico (140)
ATP7B	Hs.492280	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide	Transportador de cobre	Niveles altos de expresión relacionados con resistencia a cisplatino in vitro (266)
AKT1	Hs.525622	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Señalización vía PI3K	IHQ negativa relacionada con mejor pronóstico y valor predictivo de respuesta a QT (277)
HAT1	Hs.632532	histone acetyltransferase 1	Mantenimiento de la estructura de la cromatina	Relacionada con la reparación del daño al ADN(278) (1) Expresión requerida para la resistencia a cisplatino (279)
MYST1	Hs.533803	MYST histone acetyltransferase 1	Mantenimiento de la estructura de la cromatina	Reparación del daño al ADN, roturas de doble cadena (280)(281)(282)
GPX4	Hs.433951	Glutathione peroxidase	Equilibrio REDOX	Actividad antiapoptótica mediante la regulación actividad 15 lipooxigenasa, papel en carcinogénesis y angiogénesis tumoral (283)(284)
MDR1	Hs.489033	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1	Bomba transportadora dependiente de ATP	Sobreexpresión relacionada con quimiorresistencia y mal pronóstico(285)(286)
FRAP1	Hs.338207	Mechanistic target of rapamycin	Señalización vía PI3K	Sobreexpresión asociada a mal pronóstico (287)(288) y quimiorresistencia a platino (272)(289)

Tabla 20: Papel en CPNM de los genes escogidos de la literatura y valor en CPNM.

3. Estudio de expresión génica mediante qPCR en pacientes con CPNM avanzado:

En este trabajo hemos evaluado mediante qPCR el valor pronóstico y predictivo de los 17 genes seleccionados del análisis SAGE y de la literatura en una muestra de pacientes con CPNM avanzado. Esta evaluación se ha llevado a cabo a partir de tejido tumoral parafinado procedente de la biopsia diagnóstica realizada en estos pacientes. Analizaremos en este apartado las características de nuestra muestra y su potencial representatividad, así como cuestiones específicas en relación al material biológico empleado en el estudio.

3.1. Características de la muestra y representatividad:

Entre los factores clínico-patológicos evaluados al diagnóstico en los pacientes incluidos en nuestro estudio, el estado general del paciente medido por la escala ECOG y la histología del tumor mostraron asociación con la evolución de la enfermedad, si bien sólo el ECOG 1 y la histología de células grandes se asociaron a un empeoramiento significativo de la supervivencia global. Estos resultados han de ser considerados con cautela debido al reducido tamaño muestral de partida. No obstante, están en consonancia con los datos ofrecidos por otros estudios. El estado general del paciente es el factor dependiente del huésped más importante para la determinación pronóstica, siendo menor la supervivencia cuando el estado general del paciente es peor (295) (296). Otros factores del huésped, como el sexo o la edad del paciente, no han sido suficientemente clarificados, aunque los últimos estudios sugieren un mejor pronóstico para el sexo femenino y la edad más baja (297). Con respecto a los parámetros propios del tumor, hasta la fecha no hay evidencia sólida para la relación entre el subtipo histológico de la enfermedad y el pronóstico de la misma (298) . El carcinoma de células grandes se ha asociado a peor pronóstico en una de las series publicadas por el grupo ECOG (299) mientras que en estudios posteriores no se ha hallado ninguna relación entre la histología tumoral y el pronóstico (300).

Por otra parte se ha evidenciado la relación entre la respuesta tumoral a la quimioterapia basada en platino y el pronóstico de la enfermedad en nuestra muestra.

El tratamiento quimioterápico de esta enfermedad, añadido al tratamiento de soporte, mejora la supervivencia de los pacientes cuando se compara con el tratamiento de soporte empleado de forma exclusiva (301) . Pero además, la respuesta a quimioterapia se ha relacionado específicamente con la supervivencia a un año de los pacientes, tal y como muestra un metanálisis sobre 16 estudios de CPNM avanzado (302) . En nuestra muestra, se observa una relación estadísticamente significativa entre la SLP y SG en aquellos pacientes que obtienen respuesta o estabilización de la enfermedad tras 3 meses de tratamiento quimioterápico y aquellos cuya enfermedad progresa, por lo que resulta plausible atribuir un valor pronóstico adicional a la respuesta a quimioterapia observada en los pacientes. No obstante, se ha analizado por separado del resto de factores clínico-patológicos clásicos ya que este parámetro sólo es posible evidenciarlo tras 3 meses de tratamiento quimioterápico.

3.2. Aplicabilidad de los resultados:

Como ya se ha expuesto previamente, el pilar fundamental en el tratamiento del CPNM avanzado es la quimioterapia, en especial la basada en derivados del platino. En los últimos años, fruto del estudio de los mecanismos moleculares subyacentes en CPNM, se han descrito e incorporado nuevos agentes farmacológicos al tratamiento de esta enfermedad, tales como bevacizumab, gefitinib y erlotinib o más recientemente crizotinib. En el momento de la realización de nuestro estudio, algunos de estos agentes se encontraban en fase de desarrollo clínico y sólo bevacizumab empezaba a incorporarse a la rutina de tratamiento de estos pacientes, razón por la cual el estudio se ha realizado sobre la base del tratamiento quimioterápico con derivados del platino. Los pacientes candidatos a tratamiento con las nuevas terapias dirigidas (gefitinib, erlotinib, crizotinib) representan entre un 10 y un 20% del total y se identifican en la rutina diagnóstica actual mediante el estudio de las alteraciones genéticas que definen la sensibilidad a estos tratamientos. El resto de pacientes siguen siendo candidatos al empleo de quimioterapia basada en platino como primera línea de tratamiento. Por ello, consideramos que los resultados obtenidos en nuestro estudio serían aplicables a la mayor parte de los pacientes tratados en la práctica clínica habitual. En el caso de bevacizumab, la progresiva adición a la quimioterapia estándar en cada vez un mayor número de pacientes haría necesario validar nuestros resultados en esta situación específica. No obstante, bevacizumab ha demostrado beneficio clínico cuando se

emplea añadido a la quimioterapia estándar, beneficio que no ha podido ser demostrado con su empleo en monoterapia. Tampoco existen factores pronósticos o predictivos de respuesta a este fármaco que hayan sido validados prospectivamente, y que determinen un grupo de pacientes donde este fármaco se asocie con un beneficio especialmente significativo de tratamiento o un cambio de respuesta a la quimioterapia. Finalmente, desde el punto de vista biológico y del mecanismo de acción del fármaco, bevacizumab tendría un papel fundamentalmente coadyuvante y facilitador de la acción de la quimioterapia, siendo ésta la base del tratamiento de estos pacientes (303) .

3.3. Muestras biológicas:

Con el fin de obtener una herramienta que pudiera ser empleada en el contexto clínico habitual de los pacientes, hemos desarrollado nuestro trabajo en la serie de pacientes con CPNM avanzado empleando como muestras de partida tejido parafinado procedente de biopsias. Hasta hace pocos años, la realización de estudios con PCR cuantitativa quedaba restringida al empleo de tejido fresco congelado, ya que el proceso de fijación en formol e inclusión en parafina producía la degradación del ARN presente en el tejido en pequeños fragmentos que limitaban el empleo de esta técnica. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la posibilidad de emplear tejido parafinado para la realización de este tipo de análisis génico (304) (305) . Dado que el ARN se degrada en una mayor medida en tejido parafinado, la solución radica en el empleo de amplicones más cortos que permitan reconocer y amplificar dichos fragmentos de ARN, y en la normalización de los resultados de expresión obtenidos frente a genes de expresión tisular constante ya conocidos (306). Así, se han desarrollado en los últimos años diversos perfiles de expresión sobre muestras de tejido parafinado, algunos de los cuales ya están acreditados y disponibles para el uso en la rutina clínica habitual, como el test Oncotype DX ® para la evaluación pronóstica en cáncer de mama temprano (307) .

Por otra parte, la relevancia del uso de muestras procedentes de biopsia en nuestro estudio es destacable desde el punto de vista de la aplicabilidad futura de los resultados. Los pacientes con CPNM avanzado se consideran en su inmensa mayoría no candidatos a cirugía del tumor primario. El diagnóstico se realiza en la mayor parte de los casos a partir del tejido histológico procedente de biopsias, y éste es con

frecuencia el único material histológico del que se dispone para la realización de estudios moleculares con fin diagnóstico, terapéutico o de investigación. El estudio llevado a cabo por Zanetti-Dällenbach y colaboradores, estableció la representatividad de los estudios de expresión génica obtenidos a partir de biopsias tumorales por comparación directa con la expresión génica en las piezas quirúrgicas correspondientes a los mismos tumores, encontrando que ambos perfiles eran superponibles (308). Por otra parte, la determinación de perfiles génicos a partir de muestras procedentes de biopsia sólo ha sido posible mediante el avance en las técnicas de análisis génico, que actualmente permiten la obtención de complejos perfiles de expresión a partir de cantidades de material muy bajas (del orden de decenas de nanogramos por cada reacción de PCR).

4. Establecimiento de un modelo pronóstico de dos genes:

El análisis de expresión génica mediante qPCR de los 17 genes escogidos en la muestra de pacientes avanzados nos ha permitido definir un modelo o *score* pronóstico basado en la expresión de dos genes, EGR1 y ERCC1, que muestra una asociación estadísticamente significativa e independiente del resto de factores pronósticos analizados para la predicción de la SLP y la SG de los pacientes en el momento del diagnóstico.

4.1. EGR1

El gen EGR1 (del inglés *early growth response-1*) es el que mayor peso específico tiene en el *score* pronóstico que hemos definido en nuestro trabajo (valor coeficiente 0.472 en el *score* pronóstico). EGR1 presentó en el estudio de SAGE unos niveles de expresión significativamente superiores en los tumores resistentes a cisplatino con respecto a los tumores sensibles, siendo la primera vez que se propone la relación entre la sobreexpresión de este gen y la resistencia a cisplatino en CPNM. El potencial valor de EGR1 como marcador de mal pronóstico derivado de una deficiente respuesta tumoral a la quimioterapia se confirmó después en el estudio de expresión en pacientes con CPNM avanzado tratados con quimioterapia basada en platino. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de EGR1 constituye un

factor de mal pronóstico, asociándose a una disminución en la supervivencia en estos pacientes (HR 1.6, IC 95% 1.14-2.25).

El gen EGR1 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5, en la región 31.2. Codifica para la proteína EGR1, de 543 aminoácidos, que presenta un dominio de unión al ADN altamente conservado compuesto por 3 motivos en dedos de zinc. EGR1 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas EGR de respuesta temprana, que activa la transcripción de numerosos genes, entre los que se encuentran factores de crecimiento y sus receptores, proteínas de la matriz extracelular, proteínas reguladoras del ciclo celular y la diferenciación, y proteínas implicadas en los procesos de apoptosis, parada en ciclo y respuesta a estrés (309). La expresión de EGR1 se activa de forma rápida y transitoria frente a estímulos mitogénicos tales como PDGF, factores de crecimiento o B-Raf; y no mitogénicos, como la irradiación o la hipoxia (310), y es regulada principalmente por dos elementos represores, NAB1 (constitutivamente expresado en todas las células) y NAB2, inducido por EGR1 y responsable de la modulación fina de su actividad mediante un circuito de regulación negativa. Numerosos estudios sitúan a EGR1 como un regulador poliédrico y versátil en diversas neoplasias humanas, y su papel como gen supresor o como oncogén no ha podido definirse de forma clara, sino dependiente del contexto celular (311).

En CPNM, varios estudios clásicos han determinado la regulación a la baja en la expresión de este gen como elemento diferenciador frente al tejido pulmonar sano. El estudio publicado por el Grupo de Estudio del Cáncer de Pulmón en el año 1995, analizó la expresión de EGR1, c-Jun y c-Fos sobre 101 muestras de CPNM y tejido pulmonar adyacente normal, hallando una expresión de estos genes significativamente mayor en el tejido normal en el 72% de los casos (312). Un segundo estudio de análisis de expresión sobre 7 tumores epidermoides y 7 adenocarcinomas resecaados, encontró que la expresión de este gen se encontraba disminuida en al menos un 50% en ambos subtipos tumorales con respecto al tejido pulmonar normal (313). El primer estudio que analizó la relación entre la expresión de EGR1 y el pronóstico en CPNM fue conducido por Ferraro y colaboradores. Este grupo analizó mediante qPCR la expresión de EGR1 y PTEN en 125 muestras de CPNM resecaado estadios I a III, encontrando una relación directa entre los niveles de expresión de ambos genes, con

independencia de la histología o el estadio tumoral. Los niveles altos de EGR1 se correlacionaron con una mayor SG ($p=0.040$) y una tendencia no significativa a una mayor supervivencia libre de enfermedad ($p=0.096$). En el análisis estratificado por estadio clínico, la expresión de EGR1 mostró una asociación inversa con la supervivencia, si bien muy cercana al límite de la significación estadística ($p=0.055$)(254). Aunque no existían evidencias mecanísticas que explicaran el papel preciso de EGR1 en CPNM, los datos de expresión de estos estudios situaron a EGR1 como gen supresor tumoral en CPNM.

Sin embargo en nuestro estudio EGR1 se comporta como un factor de mal pronóstico en la serie de pacientes con tumores avanzados tratados con quimioterapia. La comparación de nuestros resultados con la del estudio previamente expuesto ha de realizarse considerando varias cuestiones: En primer lugar, el estudio de Ferraro se realizó sobre tumores en estadios tempranos sometidos a cirugía y por lo tanto, las alteraciones génicas y moleculares presentes en CPNM avanzado pueden diferir con respecto a esta situación. A medida que el tumor va progresando, las vías implicadas en angiogénesis, invasión y metástasis adquieren un papel más destacado en la progresión tumoral, y ello podría explicar la intervención de EGR1 en estas fases de la enfermedad, como se ha evidenciado en posteriores estudios que se expondrán a continuación. En segundo lugar, el estudio es anterior al establecimiento de la quimioterapia adyuvante en CPNM, por lo que el pronóstico de los pacientes se deriva exclusivamente de las características inherentes a la enfermedad, sin modificaciones mediadas por el tratamiento recibido posteriormente a la cirugía. Por el contrario, en pacientes con CPNM avanzado la respuesta a la quimioterapia basada en platino tiene un peso específico en el pronóstico de estos pacientes, que se añade al de las características de la enfermedad neoplásica. Precisamente este hecho resulta relevante en nuestro caso, ya que la selección de EGR1 como potencial gen candidato para la predicción pronóstica se ha realizado sobre la base de su expresión diferencial en tumores que mostraban resistencia al tratamiento con cisplatino.

Como ya hemos mencionado, estudios posteriores han replanteado el rol de EGR1 en el desarrollo y progresión del CPNM, en particular su papel en las vías de angiogénesis, invasión y metástasis. La mayoría de estudios abundan en los mecanismos de acción y las interacciones de esta proteína con diversos elementos

moleculares desde la perspectiva básica y preclínica, siendo escasas, aunque presentes, las evidencias clínicas encontradas a este respecto. EGR1 activa la expresión de IGF-1, IGF-2, TGF- β 1, fibronectina, factor activador del plasminógeno tipo urokinasa, VEGF-1R, VEGF, PDGF-A y B y bFGF, elementos con importantes funciones en supervivencia celular, apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis. Kim y colaboradores estudian el valor de IGFBP-3 como elemento antiangiogénico y antitumoral. En un completo estudio realizado en líneas celulares de CPNM y ratones atímicos xenoinjertados, demuestran que IGFBP-3 bloquea la neoangiogénesis inducida por las células tumorales, bloqueando los circuitos autocrinos y paracrinós de producción de bFGF y PDGF, dos potentes factores proangiogénicos. En estos circuitos destaca el papel principal de EGR1 como activador directo de ambos genes, mediado por las vías de señalización Erk/Elk1 (256) (figura 15) . Brown y colaboradores llegan a semejantes conclusiones empleando un inhibidor del receptor de nicotina-acetilcolina α 7 (principal mediador de la acción proangiogénica de la nicotina) sobre líneas celulares de CPM y diversos modelos animales (314) . Por otra parte, Shimoyamada y colaboradores muestran el papel de EGR1 en la activación de la expresión de VEGF-A, un factor fundamental implicado en la promoción de la neoangiogénesis tumoral, aportando en este caso información del comportamiento de EGR1 en muestras clínicas de CPNM. Estos autores analizan la expresión de EGR1, VEGF-A, HIF-1 α , y los represores de EGR1, NAB1 y NAB2, mediante inmunohistoquímica en 101 muestras de adenocarcinoma de pulmón resecado. Encuentran una fuerte correlación directa entre los niveles de expresión de EGR1 y de VEGF-A en todos los casos, y un mayor nivel de expresión de HIF-1 α , EGR1 y VEGF-A a medida que los tumores son más desdiferenciados. Un hallazgo interesante fue que la expresión de NAB2, represor de EGR1 inducido por EGR1 y responsable de la acción transitoria de este gen, presentaba niveles menores a mayor desdiferenciación tumoral, sugiriendo un desacoplamiento de este mecanismo regulador a medida que los tumores progresan, con la plausible elevación sostenida de EGR1. Estudios *in vitro* sobre líneas celulares presentados también en este trabajo, confirmaron el papel de EGR1 como activador directo e independiente de HIF-1 α de la expresión de VEGF-A (255) . En el caso del CPNM escamoso, Bai y colaboradores aplican una serie de herramientas bioinformáticas sobre datos públicos de *arrays* de expresión de CPNM escamoso en muestras pareadas de tejido tumoral y tejido pulmonar normal de 5 pacientes (GSE3268 en la base de datos GEO) para realizar un análisis global del

transcriptoma que permita definir genes candidatos en la oncogénesis y el desarrollo de CPNM escamoso. Encuentran que EGR1 está entre los genes sobreexpresados en CPNM escamoso junto con otros factores de transcripción, y proponen una red de regulación génica en la que EGR1, junto con otros 5 genes, serían nodos principales en la oncogénesis y desarrollo de este tipo tumoral (315) .

También se ha explorado la implicación de EGR1 en los procesos de invasividad y metástasis. EGR1 promueve la expresión de la metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP9), implicada en el proceso de transición epitelio-mesénquima, en respuesta a TNF alfa. Se ha evidenciado niveles elevados de EGR1 y MMP9 en modelos animales xenoinjertados con líneas celulares de CPNM en los que se analizaba el papel de SCUBE3, un gen altamente expresado en CPNM invasivo (316).

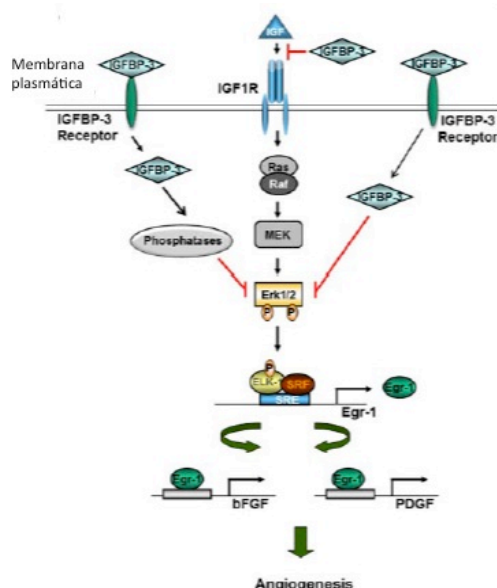


Figura 15: Implicación de EGR1 en la angiogénesis mediada por FGF y PDGF (tomado de (256))

Otra evidencia a favor del papel oncogénico de EGR1 dependiendo del contexto celular la aporta la teoría del test de consistencia en el ciclo celular, expuesta brillantemente por Zwang y colaboradores, en el que EGR1 y p53 presentan un papel central (figura 16). De acuerdo a esta teoría, para la entrada de una célula en ciclo son necesarias dos señales mitogénicas separadas en el tiempo: una primera señal, responsable por una parte de la activación de la cascada ERK-EGR1, que a su vez

activaría la transcripción de genes implicados en el metabolismo y la síntesis de biomasa; y por otra de la expresión de p53, que promovería la expresión de genes antiproliferativos. La segunda señal mitogénica, produciría por una parte la inhibición de las señales antiproliferativas, y por otra una nueva señal ERK-EGR1 más potente, que provocaría la entrada de la célula en la fase S del ciclo. Esta teoría implica dos consecuencias: por una parte, el mecanismo antiproliferativo de p53 evitaría la entrada en ciclo celular frente a señales mitogénicas esporádicas e inconsistentes en células normales (por ejemplo, mitógenos liberados por células del sistema inmune). Por otra parte, la pérdida o inactivación de p53 en el contexto tumoral supondría la progresión de las células tumorales en ciclo celular mediada por la señalización de EGR1 en respuesta a estímulos mitogénicos muy cortos. En CPNM, este mecanismo tendría una relevancia de primer orden, dado que alrededor del 50% de los tumores pulmonares presentan mutaciones en p53 (317) y en carcinoma escamoso, se ha descrito en prácticamente la totalidad de los mismos (70).

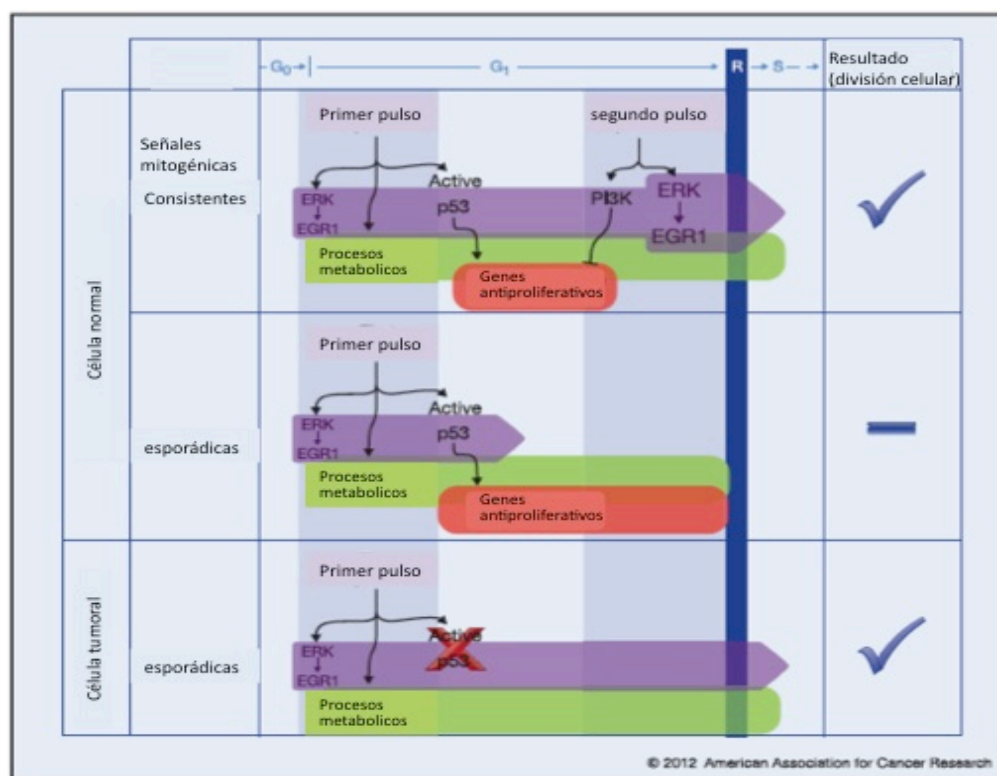


Figura 16: test de la consistencia en el ciclo celular (tomado de (317))

La relación de EGR1 en respuesta a cisplatino ha sido también un elemento explorado. Quiñones y colaboradores realizan un estudio *in vitro* con líneas celulares inmortalizadas y tumorales, en las que consiguen expresar una construcción, llamada EGFP, consistente en el acoplamiento de la secuencia del promotor del gen EGR1 con la de la proteína verde fluorescente GFP, detectable por varios métodos (FACS, RT-PCR). La exposición de varias líneas celulares a cisplatino y otros agentes genotóxicos como topotecán o mitomicina C, provocó un aumento en la expresión de la proteína EGFP en líneas celulares con p53 natural y deficiente. La inducción de la expresión de EGR1, tal y como concluyen estos autores, podría constituir una de las respuestas celulares al estrés genotóxico y mitótico en células normales y tumorales. (318). Del mismo modo, se ha encontrado un aumento en la expresión de EGR1 en respuesta a la radiación ionizante y a las especies reactivas de oxígeno mediada por los elementos de respuesta CArG encontrados en el promotor de EGR1 (319). Dado que el cisplatino produce daño en el ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno, Park y colaboradores utilizan este planteamiento para presentar un modelo en el que comprueban que el cisplatino es capaz de inducir la activación del promotor de EGR1 en líneas celulares de cáncer de esófago y colon a través de estas secuencias CArG, identificándose así el motivo de secuencia específico por el cual el cisplatino induce la expresión de EGR1 (320). Un estudio sobre líneas celulares de carcinoma de esófago muestra que el cisplatino promovería la apoptosis celular mediante la activación de EGR1 mediada por la quimioquina inflamatoria CXCL2 (321), aunque no existen datos clínicos posteriores que avalen esta observación. En CPNM no hay evidencias previas a nuestro estudio acerca del papel de EGR1 en la respuesta a platino, aunque sí se ha descrito que la pérdida de IGFBP-3, regulador negativo de EGR1, está relacionada con la resistencia a cisplatino en CPNM (195).

En conclusión, las evidencias disponibles hasta el momento actual no permiten establecer con firmeza un papel prooncogénico o supresor de EGR1 en CPNM, sino que, por el contrario, sugieren un papel dinámico y muy dependiente del contexto genético y evolutivo de la enfermedad en el que se enmarque su expresión. En nuestro estudio, encontramos que la expresión de EGR1 se encuentra incrementada en los tumores resistentes a cisplatino en comparación con los tumores sensibles al fármaco, definiendo por primera vez un potencial papel de este gen en los mecanismos de resistencia a quimioterapia en CPNM. Por otra parte, la sobreexpresión de EGR1 se

comporta como un factor de mal pronóstico en nuestra serie de pacientes con tumores avanzados tratados con quimioterapia basada en platino, lo cual parece plausible a la luz del papel prominente de EGR1 en los procesos de angiogénesis e invasividad, de la pérdida de p53 que ocurre en el desarrollo de cerca de la mitad de los tumores pulmonares humanos, y del posible papel de EGR1, definido en nuestro estudio, en la resistencia al tratamiento quimioterápico. Recientes estudios están considerando el papel de EGR1 en la resistencia a los inhibidores de EGFR, gefitinib y erlotinib (322). Del mismo modo, podemos considerar nuestros resultados como elementos generadores de hipótesis, que contribuyen a replantear desde la perspectiva clínica un papel diferenciado de EGR1 en el seno del CPNM avanzado y su tratamiento quimioterápico.

4.2 ERCC1

El gen ERCC1 (del inglés *excision repair cross-complementation group-1*) se incorporó al estudio de qPCR en la serie de pacientes avanzados por su implicación en pronóstico y respuesta a quimioterapia en CPNM analizada en numerosos estudios. Este gen se incorpora al modelo pronóstico de dos genes que se presenta en este trabajo como un factor protector, siendo sus niveles elevados un factor de buen pronóstico para los pacientes con CPNM avanzado, si bien en el límite de la significación estadística (HR 0.7, IC 95% 0.49-0.98).

Como se ha expuesto en la introducción, ERCC1 es uno de los elementos principales del sistema NER de reparación del ADN, aunque también se ha descrito su participación en otros sistemas de reparación. El gen ERCC1 se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.32) y contiene 10 exones. La proteína para la que codifica, de 297 aminoácidos, es una endonucleasa específica que dimeriza con la proteína XPF para el reconocimiento y la escisión de la cadena de ADN en posición 5' con respecto a la zona dañada, permitiendo la delimitación y eliminación de dicha zona. Este sistema elimina lesiones como los aductos generados por platino o los dímeros de timina inducidos por la radiación ultravioleta, y por ello se ha explorado su función en relación con la sensibilidad a compuestos derivados de platino (118). En este punto se ha de destacar la existencia de 4 isoformas distintas de ERCC1, producidas por *splicing* alternativo, de las cuales sólo una, la 202, se

relaciona con la actividad funcional de ERCC1 en la reparación de las lesiones provocadas por platino, mientras que las otras tres isoformas se comportan de forma neutral. Hasta el momento, no existen datos acerca de los niveles de expresión de las distintas isoformas de ERCC1 en CPNM (323) .

La revisión de la evidencia procedente de estudios básicos y preclínicos señala al sistema NER y a ERCC1 como elementos mediadores de la resistencia a platino, lo cual tiene sentido desde el punto de vista de la función de este sistema (324)(325) . Sin embargo, no en todos los estudios se consigue establecer una relación directa entre los niveles de expresión de estos genes y la respuesta a estos compuestos (326). En CPNM, Shimizu y colaboradores no encontraron correlación entre los niveles de ARNm de ERCC1, ERCC2 y RRM1 y la sensibilidad a cisplatino, carboplatino y gemcitabina en 20 líneas celulares de cáncer de pulmón (327). Más interesante resulta el estudio de Dan y colaboradores, en el que realizan un amplio análisis de expresión, comprendiendo más de 9000 genes, sobre 39 líneas celulares tumorales humanas expuestas a 55 fármacos antitumorales. Este grupo propone diversos grupos de genes relacionados con la sensibilidad a quimioterapia de acuerdo al mecanismo de acción de ésta. ERCC1 no se encuentra entre los genes seleccionados, lo que resulta llamativo dada su implicación en varios sistemas de reparación del ADN, puesto que de los 55 fármacos evaluados, 17 eran agentes mediadores de daño al ADN, entre ellos 3 compuestos derivados de platino (328). En el análisis no dirigido de la expresión génica mediante SAGE llevado a cabo en nuestro trabajo, ERCC1 no mostró una expresión diferencial entre los tumores sensibles y los resistentes a platino, lo cual estaría en concordancia con ambos estudios expuestos.

En el ámbito clínico, el valor de ERCC1 como biomarcador pronóstico y predictivo de la respuesta a platino en CPNM es un tema de candente actualidad. De modo general, y consistente con el racional biológico subyacente, los niveles bajos de expresión de ERCC1 en el seno del tumor se han asociado a un mejor pronóstico y a mayor sensibilidad a los compuestos de platino. Sin embargo, no todos los estudios realizados han mostrado resultados consistentes a este respecto. A este hecho se añaden nuevas controversias acerca de los métodos de detección de ERCC1, que obligan a una reevaluación de la información procedente de estudios anteriores.

La mayoría de estudios que evalúan el papel de ERCC1 y su valor pronóstico y predictivo de respuesta han evaluado la expresión de esta proteína mediante inmunohistoquímica. En CPNM temprano, el estudio más representativo es el de Olausson y colaboradores, en el que analizan los niveles de tinción inmunohistoquímica de ERCC1 en muestras tumorales de 761 pacientes con CPNM resecado que participaron en el ensayo IALT (comparación de tratamiento adyuvante basado en platino vs observación tras resección tumoral). En este estudio, los autores concluyeron que, en aquellos pacientes que no recibieron quimioterapia tras la cirugía, la elevación de los niveles de ERCC1 se asociaba a una mejoría en el pronóstico, mientras que en aquellos pacientes que habían recibido tratamiento adyuvante con platino, los que presentaban negatividad en la tinción para ERCC1 tenían mayores supervivencias que los pacientes con tinción positiva (124). Son varios los estudios posteriores que concluyen de forma similar en CPNM temprano (329)(330), aunque en CPNM avanzado los resultados muestran una mayor variabilidad. El estudio de Ota sobre biopsias teñidas de pacientes tratados con platino muestra una relación entre los niveles elevados de ERCC1 y una menor SG, aunque no encuentra relación con la SLP o la tasa de respuesta (126). Vilmar y colaboradores encuentran una relación entre los niveles bajos de ERCC1 y la supervivencia, sobre todo en el grupo de adenocarcinomas (331). Por el contrario, Jeong y colaboradores no encuentran relación entre los niveles de ERCC1 por inmunohistoquímica y la tasa de respuesta o la supervivencia en pacientes con CPNM localmente avanzado tratado con quimio-radioterapia (68) , y tampoco se encuentra esta asociación en el estudio de Reynolds sobre pacientes con CPNM avanzado (332)

Con respecto a los estudios que evalúan los niveles de ARNm de ERCC1 mediante qPCR, también encontramos resultados contrapuestos. El primer estudio publicado por Lord y colaboradores evidenció la asociación entre los niveles bajos de ERCC1 y la mejor supervivencia en CPNM avanzado (125) , resultados que son opuestos a los hallados en el estudio de Booton, que no encuentra relación entre los niveles de ERCC1 y la supervivencia o la respuesta a tratamiento en pacientes con CPNM avanzado (127) . Por otra parte, las conclusiones del ensayo español sobre pacientes con CPNM avanzado en primera línea de tratamiento, en el que se comparó el tratamiento estándar basado en platino con la elección del tratamiento quimioterápico en base a los niveles de ERCC1 son poco esperanzadoras en cuanto

al valor pronóstico y predictivo de ERCC1 de forma aislada: la tasa de respuesta, inicialmente más elevada en el brazo de tratamiento basado en los niveles de ERCC1, no mostró diferencias significativas tras realizar un análisis estricto por intención de tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas en SLP y SG (128) . Finalmente, la correlación entre los datos de qPCR e inmunohistoquímica para la valoración de la expresión de ERCC1 no es óptima: en un estudio sobre 92 muestras de CPNM en el que se evaluó la expresión de ERCC1 por inmunohistoquímica y qPCR, el 33% de las muestras clasificadas como ERCC1 positivas por inmunohistoquímica presentaron niveles bajos de expresión por qPCR, mientras que el 32% de las muestras con expresión elevada por qPCR fueron clasificadas como ERCC1 negativas por inmunohistoquímica (333) .

A la complejidad en la evaluación de ERCC1 como marcador predictivo y pronóstico en clínica se ha añadido un artículo publicado recientemente que ha revolucionado la perspectiva de los estudios publicados en este contexto. Este trabajo proviene del mismo grupo que presentó los datos relativos a ERCC1 en la predicción pronóstica en los pacientes del estudio IALT, anteriormente expuesto. Los autores muestran la imposibilidad para validar los resultados de ERCC1 obtenidos en aquel estudio en dos cohortes de muestras independientes procedentes de los estudios JBR.10 y CALGB 9633. Asimismo, describen una importante discrepancia entre la tinción original de las muestras empleadas en el primer estudio y la retinción de las mismas empleando otro lote del mismo anticuerpo utilizado, 8F1, lo que refleja diferencias en el funcionamiento de este anticuerpo a lo largo del tiempo, posiblemente debidas a cuestiones de producción. Por último, estos autores analizan la expresión de las diferentes isoformas de ERCC1 en muestras de tumores resecados y en líneas celulares de CPNM, encontrando una expresión heterogénea de las mismas, y proporcionando evidencia preclínica adicional de que la única isoforma funcional es la 202. La mayoría de las técnicas de qPCR utilizan *primers* que amplifican todas las isoformas de ERCC1, y los anticuerpos anti-ERCC1 para inmunohistoquímica, analizados también en ese estudio, no muestran especificidad por ninguna de las isoformas descritas (334).

Un campo hasta ahora poco explorado y que puede aportar luz sobre el papel real de ERCC1 en CPNM y la respuesta a platino es la función de ERCC1 fuera del

contexto de la reparación del ADN. El dímero ERCC1-XPD está implicado en el mantenimiento de la estructura de los telómeros. Estudios *in vitro* han evidenciado la presencia de alteraciones cromosómicas específicas (elementos circulares extracromosómicos) en células deficientes en ERCC1, dichas alteraciones son similares a las que se han observado en células tumorales con resistencia múltiple a fármacos (335) . También se ha propuesto un papel regulador de ERCC1 sobre el ciclo celular. La presencia de ERCC1 es necesaria para la segregación cromosómica y la progresión durante la mitosis de las células tumorales, mientras que su deficiencia provoca un retraso en la mitosis y multinucleación celular, este papel de ERCC1 parece independiente de la presencia de XPF (336) . Por último, el dímero ERCC1/XPD podría actuar como facilitador de la transcripción durante el desarrollo. En hepatocitos, ERCC1/XPD es reclutado junto a la ARN polimerasa II y la maquinaria de transcripción en los promotores génicos, y su acoplamiento a los promotores se acompaña de demetilación del ADN y modificaciones en las histonas compatibles con el inicio de la transcripción (337) . Por el momento, no existen estudios en el ámbito clínico que analicen estos nuevos roles propuestos para ERCC1 y su potencial papel en cáncer.

Todos estos datos ayudan a enmarcar el valor de ERCC1 en CPNM en el momento actual. Pese a que desde el punto de vista biológico ERCC1 sea un candidato ideal para explicar la sensibilidad o resistencia a compuestos derivados del platino, no se pueden extraer conclusiones consistentes con respecto a su valor como biomarcador en clínica (338). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son plausibles en el contexto de la evidencia disponible. ERCC1 no mostró una expresión diferencial en el estudio de SAGE que hemos realizado, lo que sugiere la necesidad de ponderar el papel de este gen en el proceso de resistencia a platino y valorar la implicación de otras vías alternativas. En cuanto a la relación de ERCC1 con la supervivencia encontrada en nuestra serie de pacientes con CPNM avanzado, nuestros resultados son concordantes con los obtenidos en el estudio de Suwinski y colaboradores, que se expondrá posteriormente. En este estudio, ERCC1 también se comporta como factor favorable de supervivencia en el perfil genético que proponen sobre pacientes con CPNM avanzado (230). El estudio de las diferentes isoformas de ERCC1, la integración de la información de ERCC1 con la de otros genes o vías implicadas en la reparación del ADN, e incluso el estudio del papel de ERCC1 en

procesos no relacionados con la reparación del ADN, ayudarán a esclarecer en el futuro el papel de este gen en CPNM.

5. Análisis de la expresión génica en relación con la respuesta a quimioterapia basada en platino:

Hemos analizado la relación entre los niveles de expresión de los 17 genes escogidos en la muestra de pacientes avanzados y la respuesta a quimioterapia observada a los 3 meses de tratamiento. Hemos obtenido una asociación significativa entre los niveles de expresión de 2 genes, APEX1 y HAT1, mientras que para un tercer gen, FRAP1, la asociación se encontraba cercana al límite de la significación estadística. Sin embargo, estos genes no mantuvieron su valor predictivo independiente cuando se incorporaron al análisis multivariante, y por ello tampoco pudo generarse un *score* para predicción de respuesta. Por otra parte, el perfil pronóstico basado en la expresión de EGR1 y ERCC1 no mostró una capacidad predictiva suficiente para clasificar a los enfermos respondedores de los no respondedores al tratamiento de primera línea con quimioterapia basada en platino.

En este apartado hay dos cuestiones a valorar. En primer lugar, ninguno de los genes que han mostrado asociación o tendencia a la misma con la respuesta a platino provienen de los genes seleccionados en el estudio de SAGE, sino que se trata de genes escogidos desde la literatura por su relación con el pronóstico o la respuesta al tratamiento. Como ya se ha expuesto, una de las limitaciones del estudio de SAGE es que fue conducido sobre un pequeño número de muestras por lo que puede no identificar determinados genes relevantes en el evento estudiado. Por esta razón se escogió en este estudio un método de selección génica que incorporase genes con valor pronóstico y predictivo de respuesta constatado en otros estudios.

En segundo lugar, tal y como se ha evidenciado en estudios previos y en el análisis de nuestra muestra, en CPNM avanzado la respuesta a quimioterapia está relacionada con el pronóstico, de modo que aquellos pacientes con una buena respuesta a quimioterapia suelen presentar mayor SLP y SG que aquellos que muestran progresión. Sin embargo, el perfil génico identificado en nuestra muestra

para la predicción pronóstica no presenta capacidad predictiva de la respuesta a platino. Este resultado, contrario a lo inicialmente esperado, ya se ha observado en estudios previos como el de Van Laar y colaboradores, estos autores muestran el escaso solapamiento entre los genes predictores de pronóstico y de respuesta a quimioterapia, aún siendo analizados sobre las mismas muestras de pacientes (226). Lo mismo ocurre en el estudio de Oshita que se expondrá en el apartado siguiente (224). Aunque desde el punto de vista molecular se ha demostrado la interrelación entre varias de las vías mediadoras de ambos eventos, también se ha de contemplar la posibilidad de que pronóstico y respuesta a tratamiento estén influenciados también por factores génicos y moleculares propios. La intervención de los mecanismos de quimiorresistencia puede influir en la selección de los clones celulares responsables de la progresión tumoral en CPNM avanzado, por otra parte la intervención de vías accesorias e independientes (angiogénesis, transición epitelio-mesénquima) promueven dicha progresión independientemente de la sensibilidad a quimioterapia y condicionan el pronóstico del paciente. Desde el punto de vista clínico, esta disociación entre pronóstico y respuesta es en algunos casos aún más evidente, ya que en CPNM avanzado resulta necesario ponderar la influencia de segundas y sucesivas líneas de tratamiento sobre el pronóstico y la supervivencia de los pacientes. En torno a un 40-50% de los pacientes hoy día las reciben tras evidenciarse la progresión a la primera línea de tratamiento quimioterápico (339).

Los avances en las técnicas de análisis masivo de expresión están permitiendo generar “paisajes” genómicos que aportan una visión más completa y precisa del rol de las alteraciones génicas encontradas en la patogénesis y evolución del CPNM (70). En un futuro, la aplicación de estas técnicas permitirá resolver estas incógnitas, al poder delimitar netamente la influencia de los distintos eventos génicos en el pronóstico y la respuesta a quimioterapia en estos tumores.

6. Perfil pronóstico basado en la expresión de EGR1 y ERCC1: relevancia, limitaciones y futuras líneas de trabajo:

En nuestro estudio proponemos un perfil basado en la expresión de dos genes, EGR1 y ERCC1, que se correlaciona con la SLP y la SG en una muestra de pacientes

con CPNM avanzado tratados con derivados de platino. Este perfil permite definir dos subgrupos de pacientes, de alto y bajo riesgo, con medianas de SLP y SG bien diferenciadas, que complementa la información aportada por los factores clínico-patológicos clásicos en el momento del diagnóstico.

La mayoría de los perfiles génicos en CPNM se han desarrollado en el entorno de la enfermedad temprana y resecable, con el objetivo fundamental de identificar aquellos pacientes con un buen pronóstico de entrada y escasas posibilidades de recaída de aquellos cuya enfermedad tuviera mayores posibilidades de recurrir. Sin embargo, sorprende el escaso número de estudios que analizan el pronóstico o la respuesta a tratamiento en la enfermedad avanzada, siendo el mayor número de pacientes con CPNM diagnosticados en esta situación. Además, a diferencia de los estudios en CPNM temprano, desarrollados sobre grandes series de pacientes y validados en cohortes independientes, los estudios de que disponemos en enfermedad avanzada se han realizado sobre muestras pequeñas de pacientes y en la mayor parte de los casos sin cohortes de validación. Ikehara y colaboradores analizan la expresión de cerca de 1200 genes mediante microarrays sobre muestras de biopsia transbronquial de 47 pacientes y definen un perfil basado en 3 genes (Ciclina G1/S, proteína kinasa dependiente de AMPc y proteína similar al factor de crecimiento de hepatocitos) en el que los niveles elevados de expresión de uno o más de estos tres genes predecían una mayor SG (340). Oshita y colaboradores definen sobre la misma muestra de pacientes la relación independiente de otros tres genes, el del factor de inflamación alométrico, la subunidad invariable del antígeno HLA-DR, y el precursor del MHC-clase II HLA-DR-beta, con la quimiorresistencia a esquemas basados en platino. Si bien en el contexto de la enfermedad avanzada la respuesta a platino es uno de los principales determinantes pronósticos, estos autores definen dos grupos de genes diferentes asociados con pronóstico y con respuesta a platino (224).

Otro estudio, llevado a cabo por Baty y colaboradores, realizó un análisis de expresión mediante microarrays sobre muestras procedentes de biopsia transbronquial de 41 pacientes diagnosticados de CPNM en estadios precoces y avanzados, estableciendo un perfil de 13 genes que se correlaciona, junto con el estadio tumoral, con la SG de los pacientes y es capaz de predecirla para todos los estadios tumorales. Este perfil fue validado en una serie de datos independiente, aunque dichos datos

procedían exclusivamente de adenocarcinomas (341) . Finalmente, el estudio de Suwinski y colaboradores, publicado en 2012, analiza la expresión de 11 genes (ERCC1, EGFR, BRCA1, CSF1, CA9, DUSP6, STAT1, ERBB3, MMD, FN1 y CDKN1B) sobre 60 biopsias obtenidas por broncoscopia de pacientes con CPNM inoperable, de los cuales, aproximadamente un 50% correspondían a estadios localmente avanzados y el otro 50% a pacientes metastásicos. De los 11 genes analizados, sólo ERCC1 muestra una asociación significativa con la SG, mientras que otros 4 genes presentan una tendencia en el límite de la significación estadística. De estos 5 genes, finalmente sólo ERCC1 y CA9 mostraron un valor pronóstico independiente en el análisis multivariante, y lo mantuvieron tras la inclusión del estadio clínico en el análisis. En este estudio, ERCC1 se comporta en la serie de pacientes analizados como un factor protector, con una HR de 0,43 (IC 95% 0.22-0.84) en el análisis multivariante incluyendo el estadio clínico. Así, la elevación de los niveles de expresión de ERCC1 se asocia a un mejor pronóstico de los pacientes, lo que es concordante con los resultados que hemos obtenido en nuestro trabajo. De nuevo este estudio carece de validación en una cohorte independiente, y presenta un *score* pronóstico sobre una cohorte heterogénea de pacientes (estadios III y IV), aunque mantiene su valor pronóstico al separar dicha cohorte según el estadio tumoral (230) .

El modelo pronóstico propuesto en este trabajo aporta una información novedosa en un campo muy poco explorado como es el establecimiento de perfiles genéticos pronósticos y predictivos de respuesta en CPNM avanzado. La estrategia de selección génica dual (selección bibliográfica y análisis SAGE) es innovadora con respecto a los estudios publicados tanto en enfermedad temprana como en enfermedad avanzada. Esta estrategia de selección ya ha sido empleada en trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, con exitosos resultados (227) . Por otra parte, la orientación de este estudio, buscando fundamentalmente una herramienta válida para su uso en clínica, se refleja en la realización del estudio sobre muestras de biopsia parafinadas obtenidas en la rutina diagnóstica de los pacientes, en el empleo de qPCR para el análisis, una técnica de presencia cada vez más frecuente en los centros asistenciales; y en la consecución de un modelo basado en la expresión de dos genes que de un modo sencillo permite una predicción más precisa de la supervivencia con respecto a los factores clásicos valorados en el momento del diagnóstico en cada paciente concreto. No obstante, es necesario analizar las

limitaciones del estudio presentado, con el fin de establecer las distintas vías de trabajo que permitan consolidar los resultados obtenidos y aportar un mayor racional a los hallazgos expuestos.

En primer lugar, es imperativo para el desarrollo del perfil pronóstico planteado en este trabajo, proceder a su validación en una serie independiente de pacientes (342) . Un paso previo a esta validación sería la validación interna de los datos mediante la división de la muestra en dos cohortes (de muestreo y de validación) en el estudio en el que se ha desarrollado el perfil, pero en nuestro estudio no ha sido posible dado el reducido tamaño muestral. Ha de tenerse en cuenta que, pese al reducido número de genes seleccionados, la escasez del tamaño muestral podría enmascarar genes con valor pronóstico, por ello se ha optado por incluir el total de pacientes en el grupo de desarrollo del perfil. No obstante, dado que el perfil pronóstico sólo comprende dos genes, y en su desarrollo se han empleado muestras procesadas por los medios habituales en la rutina diagnóstica, la colección de un nuevo set de muestras de pacientes con similares características y su procesamiento en similares condiciones para proceder a la validación de este perfil no debería ser un proceso complejo ni excesivamente costoso para llevarse a cabo en el futuro. Una vez finalizado este proceso, sería necesario un estudio de validación más amplio, implicando a diversos hospitales, para proceder a la validación del perfil en diversas condiciones de obtención y procesamiento de las muestras, así como para obtener confirmación de su verdadero valor en clínica con un grupo más amplio de pacientes.

Otra limitación de este perfil es que no presenta capacidad predictiva de la respuesta a quimioterapia en la muestra de pacientes estudiados. Siendo la respuesta a tratamiento un elemento fundamental en el pronóstico de los pacientes con CPNM avanzado, sería de especial interés obtener un perfil capaz de identificar a aquellos pacientes en los que el tratamiento con platino no va a producir un beneficio clínico. De este modo, podrían plantearse en estos pacientes estrategias de tratamiento alternativas y muy especialmente la participación en ensayos clínicos, con la ventaja de disponer de esta información sin la necesidad de tratar al paciente durante al menos dos meses para poder evaluar el beneficio de la terapia, y sin exponerle innecesariamente a la toxicidad derivada de la misma. En nuestro trabajo, hemos realizado un análisis no dirigido de la expresión génica sobre tumores pulmonares,

comparando la expresión entre tumores sensibles y resistentes al tratamiento con platino. Si bien la sobreexpresión diferencial de ciertos genes en los tumores resistentes a platino *a priori* señalaría la implicación de estos genes en los mecanismos de resistencia, dichos tumores –sensibles y resistentes– constituyen muestras independientes. En este sentido, tendría mucho interés realizar un análisis comparativo de la expresión génica sobre muestras de tumores pulmonares pareadas, es decir, el mismo tumor pulmonar antes y después de tratamiento quimioterápico con cisplatino. De este modo, se podrían evaluar los cambios dinámicos en la expresión de determinados genes que se verían modificados únicamente en respuesta al tratamiento con platino, eliminando la variación interindividual de la expresión génica que se da al trabajar con muestras independientes. Ello permitiría identificar de un modo más preciso y unívoco los genes implicados directamente en la sensibilidad o resistencia al tratamiento (343).

Nuestro estudio aporta información novedosa en torno a dos genes, EGR1 y ERCC1, en CPNM avanzado. La literatura muestra controversia en cuanto al papel de ambos en la patogénesis y evolución del CPNM así como en la respuesta a la quimioterapia, y en el caso de ERCC1, la necesidad de definir con precisión el modo en que este factor ha de evaluarse para hallar correlaciones fiables con los parámetros clínicos. Por ello, consideramos que nuestros resultados han de ser interpretados como elementos generadores de hipótesis, que replantean nuevamente la necesidad de analizar en profundidad el comportamiento en el escenario clínico de ambos genes y su potencial valor como elementos pronósticos y predictivos de respuesta. En este sentido, un interesante abordaje es el de combinar los datos obtenidos en el ámbito de la investigación en pacientes, basada en sistemas no modificables ni manipulables (muestras clínicas, evolución tras tratamiento, etc.) con la información proveniente líneas celulares o modelos animales, donde es posible modificar en un mayor grado las condiciones y parámetros experimentales para explicar de una forma más precisa las observaciones procedentes de la clínica (334).

Por otra parte, el estudio de SAGE ha evidenciado la expresión diferencial de numerosos genes de los cuales no se dispone de evidencia acerca de su papel en CPNM o en los mecanismos de resistencia a quimioterapia. Es obvio el interés que tiene, por una parte, analizar desde la perspectiva básica y preclínica la implicación de

estos genes en CPNM y, por otra, explorar el comportamiento de los mismos en series más amplias de pacientes comprendiendo distintos escenarios clínicos, así como su potencial valor como dianas terapéuticas para restaurar la sensibilidad tumoral a la acción de los compuestos derivados de platino o sinergizar con este tratamiento para obtener mejores resultados en respuesta y supervivencia.

Conclusiones

1. El análisis no dirigido de la expresión génica mediante la técnica de SAGE sobre muestras tumorales en fresco sometidas a tratamiento con cisplatino, ha permitido evidenciar la expresión diferencial de 153 genes entre los tumores resistentes a cisplatino y los tumores sensibles.
2. La estrategia de selección génica a partir del análisis de SAGE y mediante el estudio de la bibliografía disponible, ha generado un perfil mixto de 17 genes para su estudio mediante qPCR en una muestra de 62 pacientes con CPNM avanzado.
3. No se ha podido determinar un perfil predictor de respuesta a cisplatino a partir del análisis de expresión del perfil de 17 genes. El modelo pronóstico basado en la expresión de EGR1 y ERCC1 tampoco ha resultado válido para la predicción de la respuesta a cisplatino.
4. El análisis de expresión de este perfil de 17 genes sobre una muestra de pacientes con CPNM avanzado ha dado lugar a la generación de un modelo pronóstico basado en la expresión de dos genes: EGR1, seleccionado a partir del estudio de SAGE; y ERCC1, seleccionado a partir del estudio de la literatura. La sobreexpresión de EGR1 se asocia a un mayor riesgo de progresión en el modelo propuesto, mientras que la sobreexpresión de ERCC1 se asocia a menor riesgo de progresión.
5. El modelo pronóstico basado en la expresión de ambos genes divide a los pacientes de la muestra en dos grupos: un grupo de bajo riesgo, con medianas de SLP de 11 meses y de SG de 15 meses, y un grupo de alto riesgo, con medianas de SLP de 7 meses y de SG de 10 meses.
6. Se ha encontrado una asociación del ECOG 1 y la histología de células grandes con el pronóstico en nuestra muestra.
7. El modelo pronóstico basado en la expresión de EGR1 y ERCC1 mantiene su valor pronóstico independiente al ajustarse por dichos factores clínicos.
8. Este trabajo puede servir de base para la validación de la capacidad predictiva del modelo basado en la expresión de EGR1 y ERCC1 mediante qPCR, así como para el estudio del papel biológico de ambos genes en CPNM avanzado.

Anexos

Anexo 1: Clasificación TNM para cáncer no microcítico de pulmón (7ª edición):**Tumor primario (T)**

- **T1:** Un tumor que tiene <3 cm en su mayor dimensión, rodeado por pleura pulmonar o visceral, y sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que un lóbulo bronquial (es decir, no en el bronquio principal). [Nota: El tumor superficial no común de cualquier tamaño con su componente invasor limitado a la pared bronquial, que puede extenderse proximal al bronquio principal, también se clasifica como T1.]
 - **T1a:** tumor ≤ 2 cm de diámetro
 - **T1b:** Tumor > 2 cm pero ≤ 3 cm de diámetro.
- **T2:** Un tumor > 3 cm y ≤ 7 cm con cualquiera de las siguientes características:
 - Compromete el bronquio principal y está ≥ 2 cm distal de la carina
 - Invade la pleura visceral
 - Está relacionado con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero que no compromete todo el pulmón
 - **T2a:** tumor > 3 pero ≤ 5 cm
 - **T2b:** tumor > 5 pero ≤ 7 cm
- **T3:** Un tumor > 7 cm o con cualquiera de las siguientes características:
 - invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del surco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina pero sin compromiso de la carina.
 - atelectasia asociada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón.
 - Nódulos satélites en el mismo lóbulo pulmonar.
- **T4:** Un tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes órganos: el mediastino, el corazón, los grandes vasos, la tráquea, el esófago, el cuerpo vertebral, la carina; o nódulos satélites en distinto lóbulo pero en el mismo pulmón.

Compromiso ganglionar (N)

- **N0:** No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales
- **N1:** Metástasis a los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales, los ganglios linfáticos hiliares ipsilaterales o ambos y los ganglios intrapulmonares incluyendo el compromiso por extensión directa del tumor primario
- **N2:** Metástasis al ganglio (o ganglios) linfático mediastínico ipsilateral, subcarinal o ambos
- **N3:** Metástasis al ganglio (o ganglios) mediastínico contralateral, hiliar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclavicular

Metástasis a distancia (M)

- **M0:** No hay metástasis a distancia

- **M1:** Existe metástasis a distancia.

- **M1a:** nódulos satélites en pulmón contralateral, nódulos pleurales, o derrame maligno pleural o pericárdico [Nota: La mayoría de los derrames pleurales asociados al cáncer de pulmón se deben a un tumor; sin embargo, en unos pocos pacientes, los exámenes citopatológicos múltiples del líquido pleural son negativos para tumor. En estos casos el líquido no tiene sangre y no es exudativo. Dichos pacientes serán evaluados más a fondo por medio de una videotoracosopia y biopsias pleurales directas. Cuando estos elementos y los criterios clínicos dicen que la efusión no está relacionada con el tumor, deberá ser excluida como un elemento de clasificación.]

- **M1b:** metástasis a distancia (órganos extratorácicos)

Clasificación por estadios:

IA	T1a-T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T1a, T1b, T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a, M1b

Anexo 2: 100 genes con mayores diferencias de expresión entre los grupos de tumores resistentes y sensibles a cisplatino en el estudio SAGE.

secuencia tag	Nº copias grupo resistentes	Nº copias grupo sensibles	p	Gen
AAGGGAGCAC	72	420	0	CKAP2
AGGTCTGCCA	27	5	0	AKR1C1
CACAAACGGT	18	143	0	RPS27
CCACTGCACT	60	27	0	CCNB1IP1
CCCATCGTCC	96	42	0	Secuencia desconocida
GAAATAAAGC	40	237	0	IGHG1
GCCTGTATGA	5	74	0	RPS24
GTGGCCACGG	34	8	0	S100A9
TCTCCATACC	12	0	1,00136 E-05	PA2G4
TGTGTTGAGA	10	60	1,00136 E-05	EEF1A1
GCCGAGGAAG	9	59	3,00407 E-05	RPS12
GCGGAGGTGG	5	42	7,99894 E-05	MGC27165
CGCCGACGAT	19	7	9,0003E- 05	Interferon, alpha- inducible protein 6
AGCCCTACAA	22	10	0,00010 0017	Secuencia desconocida
GGTGGTGTCT	15	4	0,00013	GPX2

			9952	
TGGCCCCAGG	51	42	0,00014 9965	APOC1
CAAACCTAACC	19	8	0,00025 9995	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
CCGCTGCACT	10	1	0,00025 9995	ZMYND17
CGACCCCACG	41	32	0,00028 0023	APOE
AGCTCTCCCT	6	41	0,00030 9944	RPL17
GTGCACTGAG	33	23	0,00044 0001	HLA-A
GTGAAGGCAG	10	52	0,00045 0015	RPS3A
AGGCTACGGA	42	34	0,00046 0029	- Ribosomal protein L13a
ACTTTTCAA	17	7	0,00049 9964	MYO5B
CCTGTAATCC	19	9	0,00057 0059	MGC15631
GCAGGGCCTC	16	6	0,00059 998	FXD3
GTGGCGGGCG	7	0	0,00065 9943	STX8
TGGGCAAAGC	26	17	0,00083 0054	DOCK7
GTGAAACCCC	42	36	0,00090	NUBPL

			003	
CTCGCGCTGG	15	6	0,00092 9952	CLDN3
CGCCGCGGTG	14	5	0,00101 7332	EIF3C
GCCACCCCGT	10	2	0,00116 0622	G6PD
AAGGAGATGG	5	34	0,00118 7205	RPL31
ATAATTCTTT	3	27	0,00132 7276	RPS29
CTCCCCCAAG	16	64	0,00152 6356	MGC27165
GGGTTGGCTT	12	4	0,00159 7166	UQCRH
TGGAGGCCAG	8	1	0,00197 8159	SMARCD2
AACCCGGGAG	13	5	0,00205 1711	C10orf72
CCGTGGTCGT	6	0	0,00208 2586	FBL
GAGCAGCGCC	6	0	0,00208 2586	S100A7
TCCCTATTAA	2	21	0,00314 8198	Secuencia desconocida
GTGAAACCCT	25	19	0,00348 2103	WBSCR21
TTGGCCAGGC	19	12	0,00363 183	EIF2AK2
AGAAGACGTT	1	17	0,00429	IGHG3

			1892	
GTGGCTCACG	7	1	0,00445 0202	STAT3
TCGAAGCCCC	7	1	0,00445 0202	Secuencia desconocida
ATTTGAGAAG	8	2	0,00544 9295	RAD23B
GCCCCTGCTG	8	2	0,00544 9295	KRT5
TTGGTCCTCT	41	117	0,00578 2687	RBM9
CAAACCATCC	9	3	0,00661 1109	PCDHY
CGGACTCACT	5	0	0,00746 9893	STARD10
CTCCACCCGA	5	0	0,00746 9893	TFF3
GCCCAGGTCA	5	0	0,00746 9893	FLJ10815
GGGCCCCAAA	5	0	0,00746 9893	MGC13170
TTACCATATC	0	11	0,00753 7484	RPL39
GGCAAGAAGA	3	21	0,00925 4932	RPL27
ATGAGCTGAC	1	14	0,01037 8838	CSTB
GGGGACTGAA	0	10	0,01135 3374	QP-C
GGCCCTGGTG	6	1	0,01138	GAK

			8183	
GTGGCACGTG	6	1	0,01138 8183	PTRF
TGGTGTTGAG	7	32	0,01190 9008	RPS18
AAAGCACAAG	7	2	0,01312 8519	KRT6A
AAGGAGCAAG	7	2	0,01312 8519	CES1
AAGATTGGGG	4	0	0,01510 3459	FN1
ACATTGGGTG	4	0	0,01510 3459	FABP1
AGGACTTCTG	4	0	0,01510 3459	MADP-1
CAAGTTTGCT	4	0	0,01510 3459	EEF1A1
CCACTGCGCT	4	0	0,01510 3459	Secuencia desconocida
CCAGCCTGGG	4	0	0,01510 3459	STK11
CGGAGGTGGG	4	0	0,01510 3459	DGCR2
CTGGGCCTGA	4	0	0,01510 3459	LITAF
GCGAAACCCA	4	0	0,01510 3459	Secuencia desconocida
GGGAAGCAGA	4	0	0,01510 3459	RER1
GGGGATGGGG	4	0	0,01510	MGC51082

			3459	
GTGGTGGGCA	4	0	0,01510 3459	CHRND
TGAGCCCGGC	4	0	0,01510 3459	SCYL1
CGTGGTGGTG	0	9	0,02143 6214	IGHG3
CTGGGCGCCC	0	9	0,02143 6214	RHCE
GATGCTGCCA	0	9	0,02143 6214	MDS1
GGGCATCTCT	23	68	0,02205 0738	HLA-DRA
GCGAAACCCC	12	8	0,02206 5282	FLJ13448
GTACGTATTC	0	8	0,02235 6391	IGJ
GTGCGGAGGA	0	8	0,02235 6391	SAA1
GTGTTGCACA	0	8	0,02235 6391	RBM6
CCTCCAGCTA	15	11	0,02292 0012	KRT8
CCAGAACAGA	13	44	0,02340 8294	RPL30
AAACCCCAAT	6	27	0,02447 3786	IGLC2
TACCATCAAT	5	24	0,02465 4865	GAPD
AGTTTCTTGT	5	1	0,02541	CD68

			9474	
CGGCTGAATT	5	1	0,02541 9474	PGD
GATGTGCACG	5	1	0,02541 9474	KRT14
GCACTCCAGC	5	1	0,02541 9474	TRAM2
GCCAGGGCGG	5	1	0,02541 9474	HM13
GGATATGTGG	5	1	0,02541 9474	EGR1
GTGAAACTCC	5	1	0,02541 9474	HSPA5
TGAGGCCAGG	5	1	0,02541 9474	SSRP1
GGTCCAGTGT	1	12	0,02712 2378	PGAM1
GGCTGGGGGC	13	43	0,02871 9068	PFN1
GGGACGAGTG	11	7	0,02904 439	TM4SF1
GAGGGCCGGT	6	2	0,03423 4881	H2AFJ
GCAAAACCCC	6	2	0,03423 4881	FCF1

Anexo 3: Genes sobreexpresados en el grupo de tumores resistentes a cisplatino en el estudio SAGE.

secuencia tag	Nº copias grupo resistentes	Nº copias grupo sensibles	p	Gen
AGGTCTGCCA	27	5	0	AKR1C1
CCACTGCACT	60	27	0	CCNB1IP1
GTGGCCACGG	34	8	0	S100A9
TCTCCATACC	12	0	1,00E-05	PA2G4
CGCCGACGAT	19	7	9,00E-05	Interferon, alpha-inducible protein 6
GGTGGTGTCT	15	4	0,000139952	GPX2
TGGCCCCAGG	51	42	0,000149965	APOC1
CAAACCTAACC	19	8	0,000259995	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
CCGCTGCACT	10	1	0,000259995	ZMYND17
CGACCCACG	41	32	0,000280023	APOE
GTGCACTGAG	33	23	0,000440001	HLA-A
AGGCTACGGA	42	34	0,000460029	RBL13A
ACTTTTTCAA	17	7	0,000499964	MYO5B
GCAGGGCCTC	16	6	0,00059998	FXD3
GTGGCGGGCG	7	0	0,000659943	STX8
TGGGCAAAGC	26	17	0,000830054	DOCK7
GTGAAACCCC	42	36	0,00090003	NUBPL
CTCGCGCTGG	15	6	0,000929952	CLDN3
CGCCGCGGTG	14	5	0,001017332	EIF3C
GCCACCCCGT	10	2	0,001160622	G6PD
GGGTTGGCTT	12	4	0,001597166	UQCRH
TGGAGGCCAG	8	1	0,001978159	SMARCD2
AACCCGGGAG	13	5	0,002051711	C10orf72
CCGTGGTCGT	6	0	0,002082586	FBL
GAGCAGCGCC	6	0	0,002082586	S100A7
GTGAAACCCT	25	19	0,003482103	WBSCR21
GTGGCTCACG	7	1	0,004450202	STAT3
ATTTGAGAAG	8	2	0,005449295	RAD23B
GCCCCTGCTG	8	2	0,005449295	KRT5
CAAACCATCC	9	3	0,006611109	PCDHY
CGGACTCACT	5	0	0,007469893	STARD10
CTCCACCCGA	5	0	0,007469893	TFF3

GCCCAGGTCA	5	0	0,007469893	FLJ10815
GGGCCCCAAA	5	0	0,007469893	MGC13170
GGCCCTGGTG	6	1	0,011388183	GAK
GTGGCACGTG	6	1	0,011388183	PTRF
AAAGCACAAG	7	2	0,013128519	KRT6A
AAGGAGCAAG	7	2	0,013128519	CES1
AAGATTGGGG	4	0	0,015103459	FN1
ACATTGGGTG	4	0	0,015103459	FABP1
AGGACTTCTG	4	0	0,015103459	MADP-1
CAAGTTTGCT	4	0	0,015103459	EEF1A1
CCAGCCTGGG	4	0	0,015103459	STK11
CGGAGGTGGG	4	0	0,015103459	DGCR2
CTGGGCCTGA	4	0	0,015103459	LITAF
GGGAAGCAGA	4	0	0,015103459	RER1
GTGGTGGGCA	4	0	0,015103459	CHRNA
TGAGCCCGGC	4	0	0,015103459	SCYL1
GCGAAACCCC	12	8	0,022065282	FLJ13448
CCTCCAGCTA	15	11	0,022920012	KRT8
AGTTTCTTGT	5	1	0,025419474	CD68
CGGCTGAATT	5	1	0,025419474	PGD
GATGTGCACG	5	1	0,025419474	KRT14
GCACTCCAGC	5	1	0,025419474	TRAM2
GCCAGGGCGG	5	1	0,025419474	HM13
GGATATGTGG	5	1	0,025419474	EGR1
GTGAAACTCC	5	1	0,025419474	HSPA5
TGAGGCCAGG	5	1	0,025419474	SSRP1
GGGACGAGTG	11	7	0,02904439	TM4SF1
GAGGGCCGGT	6	2	0,034234881	H2AFJ
GCAAAACCCC	6	2	0,034234881	FCF1
GTGGCAGGCG	6	2	0,034234881	INTS7
AGGTCAGGAG	7	3	0,036873102	KIAA0101
GTGCGCTGAG	7	3	0,036873102	HLA-C
GCCTGCTGGG	15	13	0,04233706	GPX4
AGCCACCGCG	3	0	0,044903517	ACBD7
AGGCGAGATC	3	0	0,044903517	PSMA7
AGGCTCCTGG	3	0	0,044903517	CXCL14
AGGGGCCGGG	3	0	0,044903517	ALDH4A1
ATCACACCAC	3	0	0,044903517	LCA10
CACCAGCATT	3	0	0,044903517	EID1
CCATTCTCCT	3	0	0,044903517	BPNT1
CTCTGCCCTC	3	0	0,044903517	MYH14

CTGGGTGACA	3	0	0,044903517	PODXL2
GAAGCACAAG	3	0	0,044903517	KRT6C
GACACCTCCT	3	0	0,044903517	RUVBL2
GAGAGCTGGG	3	0	0,044903517	P2RY6
GAGCAAACGG	3	0	0,044903517	KXD1
GATCTCTTGG	3	0	0,044903517	S100A2
GCAAAACCCT	3	0	0,044903517	METTL7A
GCCGGCCCCG	3	0	0,044903517	RPS15
GGAGACAGAG	3	0	0,044903517	C1orf147
GGGATGGAAG	3	0	0,044903517	PRR5
GGTAGCTCAG	3	0	0,044903517	SPNS1
GTGAAGCCCC	3	0	0,044903517	SAV1
TACCTCTGAT	3	0	0,044903517	S100P
TCACTGCACT	3	0	0,044903517	LINC00672
TGAATGGCCT	3	0	0,044903517	KLHDC2
TGCCTGAGAT	3	0	0,044903517	MKI67
TGGCCCCCGC	3	0	0,044903517	USF2
TGGGGAGAGG	3	0	0,044903517	S100A14
TTTACAGCTG	3	0	0,044903517	DGKZ
CTGGGCCTGG	8	5	0,048614502	TCTEX1D4

Bibliografía

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. Encuesta Nacional de Salud 2006. Madrid: Instituto Nacional de Estadística; 2008.
3. Escuin J. Lung cancer in Spain. Current Epidemiology, survival, and treatment. *Arch Bronconeumol* 2009;45(7):341-8.
4. Cabanes Doménech A PGB, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2009.
5. Escuin JS MSB, Abal Arca J, Núñez Ares A, Hernández Hernández J et al. . Estudio multicéntrico epidemiológico-clínico de cáncer de pulmón en España (Estudio EpicliCP-2003). *Arch Bronconeumol* 2006;42:446-52.
6. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S.
7. Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Sep 15;170(6):691-715.
8. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005 Oct 3;93(7):825-33.
9. Turner MC, Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun MJ. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Aug 1;176(3):285-90.
10. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):5-8.
11. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Travis WD BE, Muller-Hermelink HK, Harris CC, editor. Lyon: IARC press; 2004.
12. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007 Aug;2(8):706-14.
13. Manser R, Wright G, Hart D, Byrnes G, Campbell DA. Surgery for early stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(1):CD004699.
14. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 20;26(21):3552-9.
15. Rowell NP, Williams CJ. Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. *Thorax*. 2001 Aug;56(8):628-38.
16. Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, Javier Sanchez J, Maestre J, Padilla J, et al. Preresectional chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer: a 7-year assessment of a randomized controlled trial. *Lung Cancer*. 1999 Oct;26(1):7-14.
17. Curran WJ, Jr., Paulus R, Langer CJ, Komaki R, Lee JS, Hauser S, et al. Sequential vs. concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: randomized phase III trial RTOG 9410. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Oct 5;103(19):1452-60.
18. Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2692-9.
19. Albain KS, Crowley JJ, Turrisi AT, 3rd, Gandara DR, Farrar WB, Clark JI, et al. Concurrent cisplatin, etoposide, and chest radiotherapy in pathologic stage IIIB non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group phase II study, SWOG 9019. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3454-60.
20. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell

- Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ*. 1995 Oct 7;311(7010):899-909.
21. Lilenbaum RC, Herndon JE, 2nd, List MA, Desch C, Watson DM, Miller AA, et al. Single-agent versus combination chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the cancer and leukemia group B (study 9730). *J Clin Oncol*. 2005 Jan 1;23(1):190-6.
22. Langer CJ, Manola J, Bernardo P, Kugler JW, Bonomi P, Cella D, et al. Cisplatin-based therapy for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: implications of Eastern Cooperative Oncology Group 5592, a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Feb 6;94(3):173-81.
23. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4617-25.
24. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jun 23;352(25):2589-97.
25. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2006 Sep;7(9):719-27.
26. Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, Johnson DH, Le Chevalier T, et al. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet*. 2010 Apr 10;375(9722):1267-77.
27. Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, Chevret S, Quoix E, Lebeau B, et al. Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):247-53.
28. Gilligan D, Nicolson M, Smith I, Groen H, Dalesio O, Goldstraw P, et al. Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review. *Lancet*. 2007 Jun 9;369(9577):1929-37.
29. Felip E, Rosell R, Maestre JA, Rodriguez-Paniagua JM, Moran T, Astudillo J, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 1;28(19):3138-45.
30. Burdett S, Stewart LA, Rydzewska L. A systematic review and meta-analysis of the literature: chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006 Sep;1(7):611-21.
31. Rajeswaran A, Trojan A, Burnand B, Giannelli M. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Lung Cancer*. 2008 Jan;59(1):1-11.
32. Delbaldo C, Michiels S, Syz N, Soria JC, Le Chevalier T, Pignon JP. Benefits of adding a drug to a single-agent or a 2-agent chemotherapy regimen in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2004 Jul 28;292(4):470-84.
33. Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Jun 6;99(11):847-57.
34. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002 Jan 10;346(2):92-8.
35. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 20;26(21):3543-51.

36. Soon YY, Stockler MR, Askie LM, Boyer MJ. Duration of chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3277-83.
37. Reed E. Cisplatin and its analogs. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2008. p. 49.
38. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):958-67.
39. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, et al. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2013 May 1;105(9):595-605.
40. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
41. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1227-34.
42. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561-6.
43. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1693-703.
44. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2385-94.
45. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu YR, Sanchez-Céspedes M, Yang SC, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2001 Sep 15;92(6):1525-30.
46. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1990 Aug 30;323(9):561-5.
47. Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, et al. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Feb;17(2):668-75.
48. Lu C, Soria JC, Tang X, Xu XC, Wang L, Mao L, et al. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15;22(22):4575-83.
49. Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol*. 2010 Nov 1;28(31):4769-77.
50. Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer*. 1998 Feb;77(4):663-9.
51. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):1850-5.
52. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21(20):3798-807.
53. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res*. 1997 Apr;3(4):515-22.

-
54. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2006 Nov 1;12(21):6494-501.
55. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 1991;27(11):1372-5.
56. Ardizzoni A, Cafferata MA, Paganuzzi M, Filiberti R, Marroni P, Neri M, et al. Study of pretreatment serum levels of HER-2/neu oncoprotein as a prognostic and predictive factor in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2001 Oct 1;92(7):1896-904.
57. Greatens TM, Niehans GA, Rubins JB, Jessurun J, Kratzke RA, Maddaus MA, et al. Do molecular markers predict survival in non-small-cell lung cancer? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr;157(4 Pt 1):1093-7.
58. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majumdar K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2005 Mar 1;65(5):1642-6.
59. Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer*. 2011 Oct;74(1):139-44.
60. Ross HJ, Blumenschein GR, Jr., Aisner J, Damjanov N, Dowlati A, Garst J, et al. Randomized phase II multicenter trial of two schedules of lapatinib as first- or second-line monotherapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 15;16(6):1938-49.
61. Lawrence RE, Salgia R. MET molecular mechanisms and therapies in lung cancer. *Cell Adh Migr*. 2010 Jan-Mar;4(1):146-52.
62. Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res*. 1996 Oct;87(10):1063-9.
63. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 26;104(52):20932-7.
64. Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, et al. Reaction of plasma hepatocyte growth factor levels in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Int J Cancer*. 2011 Sep 15;129(6):1410-6.
65. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, et al. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer*. 1996 Dec;74(12):1862-8.
66. Tokunou M, Niki T, Eguchi K, Iba S, Tsuda H, Yamada T, et al. c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1451-63.
67. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jul 7;89(1):55-64.
68. Jeong SH, Jung JH, Han JH, Kim JH, Choi YW, Lee HW, et al. Expression of Bcl-2 predicts outcome in locally advanced non-small cell lung cancer patients treated with cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy. *Lung Cancer*. 2010 May;68(2):288-94.
69. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
70. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012 Sep 27;489(7417):519-25.
71. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2000 Oct;6(10):4055-63.
72. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for

survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J*. 2001 Oct;18(4):705-19.

73. Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, et al. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene*. 1996 Nov 7;13(9):1971-81.

74. Kim HS, Park YH, Lee J, Ahn JS, Kim J, Shim YM, et al. Clinical impact of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, epidermal growth factor receptor, p53, and vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in resected adenocarcinoma of lung by using tissue microarray. *Cancer*. 2010 Feb 1;116(3):676-85.

75. Xu X, Sun PL, Li JZ, Jheon S, Lee CT, Chung JH. Aberrant Wnt1/beta-catenin expression is an independent poor prognostic marker of non-small cell lung cancer after surgery. *J Thorac Oncol*. 2011 Apr;6(4):716-24.

76. Nakazawa Y, Arai H, Fujita N. The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):1146-55.

77. Schramek D, Kotsinas A, Meixner A, Wada T, Elling U, Pospisilik JA, et al. The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):212-9.

78. Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J, et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1994 May 4;86(9):695-9.

79. Xu HJ, Cagle PT, Hu SX, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res*. 1996 Jul;2(7):1169-76.

80. Zagorski WA, Knudsen ES, Reed MF. Retinoblastoma deficiency increases chemosensitivity in lung cancer. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):8264-73.

81. Shapiro GI, Rollins BJ. p16INK4A as a human tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Mar 18;1242(3):165-9.

82. Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, et al. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res*. 1995 Feb 1;55(3):505-9.

83. Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yoshimatsu T, Yoshino I, et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of p16INK4 expression in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 1997 Aug 1;80(3):389-95.

84. Huang CI, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Miyake M. p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer*. 2000 Jan;82(2):374-80.

85. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 1999 Apr;5(4):791-800.

86. Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med*. 2007 Feb 22;356(8):800-8.

87. Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol*. 2006 Dec;17(12):1818-25.

88. Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*. 1996 Mar 9;347(9002):649-53.

89. Salden M, Splinter TA, Peters HA, Look MP, Timmermans M, van Meerbeeck JP, et al. The urokinase-type plasminogen activator system in resected non-small-cell lung cancer. Rotterdam Oncology Thoracic Study Group. *Ann Oncol*. 2000 Mar;11(3):327-32.

90. He C, He P, Liu LP, Zhu YS. Analysis of expressions of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127(3):180-6.
91. Volm M, Mattern J, Koomagi R. Relationship of urokinase and urokinase receptor in non-small cell lung cancer to proliferation, angiogenesis, metastasis and patient survival. *Oncol Rep*. 1999 May-Jun;6(3):611-5.
92. Almasi CE, Hoyer-Hansen G, Christensen IJ, Pappot H. Prognostic significance of urokinase plasminogen activator receptor and its cleaved forms in blood from patients with non-small cell lung cancer. *APMIS*. 2009 Oct;117(10):755-61.
93. Pritchard SC, Nicolson MC, Lloret C, McKay JA, Ross VG, Kerr KM, et al. Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their tissue inhibitors in stage II non-small cell lung cancer: implications for MMP inhibition therapy. *Oncol Rep*. 2001 Mar-Apr;8(2):421-4.
94. Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003 Feb 20;103(5):647-51.
95. Gouyer V, Conti M, Devos P, Zerimech F, Copin MC, Creme E, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer*. 2005 Apr 15;103(8):1676-84.
96. Mino N, Takenaka K, Sonobe M, Miyahara R, Yanagihara K, Otake Y, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*. 2007 Mar 1;95(3):250-7.
97. Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res*. 2000 Mar-Apr;20(2B):1311-6.
98. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun;7(6):415-28.
99. Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2009 Dec;64(12):1082-9.
100. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Dec;6(12):4739-44.
101. Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2001 Jan-Feb;8(1):72-9.
102. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 15;19(2):432-41.
103. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol*. 1999 Aug;188(4):369-77.
104. Donnem T, Al-Shibli K, Andersen S, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM. Combination of low vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)/VEGF receptor 2 expression and high lymphocyte infiltration is a strong and independent favorable prognostic factor in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2010 Sep 15;116(18):4318-25.
105. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7265-79.
106. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*. 2001 Jul 1;478(1-2):23-43.

107. Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ, et al. Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther.* 2004 Dec;3(12):1543-9.
108. Filipits M, Haddad V, Schmid K, Huynh A, Dunant A, Andre F, et al. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 1;13(13):3892-8.
109. Rudin CM, Yang Z, Schumaker LM, VanderWeele DJ, Newkirk K, Egorin MJ, et al. Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. *Cancer Res.* 2003 Jan 15;63(2):312-8.
110. Bai F, Nakanishi Y, Kawasaki M, Takayama K, Yatsunami J, Pei XH, et al. Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase-Pi can predict chemotherapy response in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 1996 Aug 1;78(3):416-21.
111. Miyatake K, Gemba K, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, et al. Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3C):2829-36.
112. Moyer AM, Sun Z, Batzler AJ, Li L, Schaid DJ, Yang P, et al. Glutathione pathway genetic polymorphisms and lung cancer survival after platinum-based chemotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Mar;19(3):811-21.
113. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res.* 1991 Jun 15;51(12):3237-42.
114. Hsu NY, Ho HC, Chow KC, Lin TY, Shih CS, Wang LS, et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2727-31.
115. Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H. Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 Nov;66(6):1103-11.
116. Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, et al. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. *Int J Cancer.* 2007 May 1;120(9):2019-27.
117. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1291-5.
118. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 1998 Oct;24(5):331-44.
119. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2004 Jul;24(13):5776-87.
120. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest.* 1994 Aug;94(2):703-8.
121. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2001 Dec 1;19(23):4298-304.
122. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1998 Jan;16(1):309-16.
123. Zeng-Rong N, Paterson J, Alpert L, Tsao MS, Viallet J, Alaoui-Jamali MA. Elevated DNA repair capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. *Cancer Res.* 1995 Nov 1;55(21):4760-4.

124. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):983-91.
125. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul;8(7):2286-91.
126. Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer*. 2009 Apr;64(1):98-104.
127. Booton R, Ward T, Ashcroft L, Morris J, Heighway J, Thatcher N. ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007 Oct;2(10):902-6.
128. Cobo M, Isla D, Massuti B, Montes A, Sanchez JM, Provencio M, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 1;25(19):2747-54.
129. Yin M, Yan J, Voutsina A, Tibaldi C, Christiani DC, Heist RS, et al. No evidence of an association of ERCC1 and ERCC2 polymorphisms with clinical outcomes of platinum-based chemotherapies in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2011 Jun;72(3):370-7.
130. Jascur T, Boland CR. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2030-5.
131. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 1996 Nov 1;56(21):4881-6.
132. Scartozzi M, Franciosi V, Campanini N, Benedetti G, Barbieri F, Rossi G, et al. Mismatch repair system (MMR) status correlates with response and survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer*. 2006 Jul;53(1):103-9.
133. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*. 2000 Apr 15;14(8):927-39.
134. Lotti LV, Ottini L, D'Amico C, Gradini R, Cama A, Belleudi F, et al. Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Nov;35(3):193-203.
135. Mullan PB, Quinn JE, Gilmore PM, McWilliams S, Andrews H, Gervin C, et al. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene*. 2001 Sep 27;20(43):6123-31.
136. Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, et al. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*. 1999 May 28;97(5):575-86.
137. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2003 Oct 1;63(19):6221-8.
138. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet*. 2004 Oct 15;13(20):2443-9.
139. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I, et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS One*. 2009;4(5):e5133.
140. Wang D, Xiang DB, Yang XQ, Chen LS, Li MX, Zhong ZY, et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer*. 2009 Dec;66(3):298-304.
141. Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reissner T, et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis

- in mammals. *EMBO J.* 2009 Feb 18;28(4):383-93.
142. Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells. *Cell Cycle.* 2009 Sep 15;8(18):3039-50.
 143. Ceppi P, Novello S, Cambieri A, Longo M, Monica V, Lo Iacono M, et al. Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):1039-45.
 144. Doles J, Oliver TG, Cameron ER, Hsu G, Jacks T, Walker GC, et al. Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol{zeta}, sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 30;107(48):20786-91.
 145. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 20;25(33):5240-7.
 146. Guntur VP, Waldrep JC, Guo JJ, Selting K, Dhand R. Increasing p53 protein sensitizes non-small cell lung cancer to paclitaxel and cisplatin in vitro. *Anticancer Res.* 2010 Sep;30(9):3557-64.
 147. Gregorc V, Ludovini V, Pistola L, Darwish S, Floriani I, Bellezza G, et al. Relevance of p53, bcl-2 and Rb expression on resistance to cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2003 Jan;39(1):41-8.
 148. Shiraishi K, Kohno T, Tanai C, Goto Y, Kuchiba A, Yamamoto S, et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 20;28(33):4945-52.
 149. Kandioler D, Stamatis G, Eberhardt W, Kappel S, Zochbauer-Muller S, Kuhrer I, et al. Growing clinical evidence for the interaction of the p53 genotype and response to induction chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 May;135(5):1036-41.
 150. Higashiyama M, Miyoshi Y, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Nishijima M, et al. p53-regulated GML gene expression in non-small cell lung cancer. a promising relationship to cisplatin chemosensitivity. *Eur J Cancer.* 2000 Mar;36(4):489-95.
 151. Oliver TG, Mercer KL, Sayles LC, Burke JR, Mendus D, Lovejoy KS, et al. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev.* 2010 Apr 15;24(8):837-52.
 152. Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e19.
 153. Wei J, Zhao J, Long M, Han Y, Wang X, Lin F, et al. p21WAF1/CIP1 gene transcriptional activation exerts cell growth inhibition and enhances chemosensitivity to cisplatin in lung carcinoma cell. *BMC Cancer.* 2010;10:632.
 154. Shih CM, Chen K, Wang YC, Lee PJ. Elevated p53 and p21waf1 mRNA expression in blood lymphocytes from lung cancer patients with chemoresistance. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(5):366-70.
 155. Morero JL, Poleri C, Martin C, Van Kooten M, Chacon R, Rosenberg M. Influence of apoptosis and cell cycle regulator proteins on chemotherapy response and survival in stage IIIA/IIIB NSCLC patients. *J Thorac Oncol.* 2007 Apr;2(4):293-8.
 156. Masuda A, Osada H, Yatabe Y, Kozaki K, Tatematsu Y, Takahashi T, et al. Protective function of p27(KIP1) against apoptosis in small cell lung cancer cells in unfavorable microenvironments. *Am J Pathol.* 2001 Jan;158(1):87-96.
 157. Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Goshima Y, Kitamura H, Teramoto S, et al. Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells. *Eur Respir J.* 2004 May;23(5):665-70.
 158. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jan 22;350(4):351-60.

159. Filipits M, Pirker R, Dunant A, Lantuejoul S, Schmid K, Huynh A, et al. Cell cycle regulators and outcome of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer: the International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 1;25(19):2735-40.
160. Losert D, Pratscher B, Soutschek J, Geick A, Vornlocher HP, Muller M, et al. Bcl-2 downregulation sensitizes nonsmall cell lung cancer cells to cisplatin, but not to docetaxel. *Anticancer Drugs*. 2007 Aug;18(7):755-61.
161. Kumar Biswas S, Huang J, Persaud S, Basu A. Down-regulation of Bcl-2 is associated with cisplatin resistance in human small cell lung cancer H69 cells. *Mol Cancer Ther*. 2004 Mar;3(3):327-34.
162. Liu JL, Wang Y, Jiang J, Kong R, Yang YM, Ji HF, et al. Inhibition of survivin expression and mechanisms of reversing drug-resistance of human lung adenocarcinoma cells by siRNA. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Oct;123(20):2901-7.
163. Belyanskaya LL, Hopkins-Donaldson S, Kurtz S, Simoes-Wust AP, Yousefi S, Simon HU, et al. Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation. *Int J Cancer*. 2005 Dec 10;117(5):755-63.
164. Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierski J, Smolen A, Pilecka I, Jablonka A. Survivin antiapoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer: in situ hybridization study. *Folia Histochem Cytobiol*. 2005;43(4):237-42.
165. Chen P, Li J, Ge LP, Dai CH, Li XQ. Prognostic value of survivin, X-linked inhibitor of apoptosis protein and second mitochondria-derived activator of caspases expression in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Respirology*. 2010 Apr;15(3):501-9.
166. Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, et al. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*. 2003 Feb 15;63(4):831-7.
167. Li J, Wang F, Haraldson K, Protopopov A, Duh FM, Geil L, et al. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6438-43.
168. Ueda K, Kawashima H, Ohtani S, Deng WG, Ravoori M, Bankson J, et al. The 3p21.3 tumor suppressor NPRL2 plays an important role in cisplatin-induced resistance in human non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9682-90.
169. Jayachandran G, Ueda K, Wang B, Roth JA, Ji L. NPRL2 sensitizes human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells to cisplatin treatment by regulating key components in the DNA repair pathway. *PLoS One*. 2010;5(8):e11994.
170. Irigoyen M, Pajares MJ, Agorreta J, Ponz-Sarvisé M, Salvo E, Lozano MD, et al. TGFBI expression is associated with a better response to chemotherapy in NSCLC. *Mol Cancer*. 2010;9:130.
171. Wang X, Chen W, Lin Y. Sensitization of TNF-induced cytotoxicity in lung cancer cells by concurrent suppression of the NF-kappaB and Akt pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 13;355(3):807-12.
172. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):3986-97.
173. Lee MW, Kim DS, Min NY, Kim HT. Akt1 inhibition by RNA interference sensitizes human non-small cell lung cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer*. 2008 May 15;122(10):2380-4.
174. Liu LZ, Zhou XD, Qian G, Shi X, Fang J, Jiang BH. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer Res*. 2007 Jul 1;67(13):6325-32.
175. Chen W, Bai L, Wang X, Xu S, Belinsky SA, Lin Y. Acquired activation of the Akt/cyclooxygenase-2/Mcl-1 pathway renders lung cancer cells resistant to apoptosis. *Mol Pharmacol*. 2010 Mar;77(3):416-23.
176. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, et al.

Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998 Sep 1;58(17):3761-4.

177. Aruajo AM, Mendez JC, Coelho AL, Sousa B, Barata F, Figueiredo A, et al. Phase II study of celecoxib with cisplatin plus etoposide in extensive-stage small cell lung cancer. *Cancer Invest.* 2009 May;27(4):391-6.

178. Suzuki R, Yamamoto M, Saka H, Taniguchi H, Shindoh J, Tanikawa Y, et al. A phase II study of carboplatin and paclitaxel with meloxicam. *Lung Cancer.* 2009 Jan;63(1):72-6.

179. Mutter R, Lu B, Carbone DP, Csiki I, Moretti L, Johnson DH, et al. A phase II study of celecoxib in combination with paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Mar 15;15(6):2158-65.

180. Mountzios G, Planchard D, Besse B, Validire P, Girard P, Devisme C, et al. Mitogen-activated protein kinase activation in lung adenocarcinoma: a comparative study between ever smokers and never smokers. *Clin Cancer Res.* 2008 Jul 1;14(13):4096-102.

181. Planchard D, Camara-Clayette V, Dorvault N, Soria JC, Fouret P. p38 mitogen-activated protein kinase signaling, ERCC1 expression, and viability of lung cancer cells from never or light smoker patients. *Cancer.* 2012 Mar 13.

182. Hernandez Losa J, Parada Cobo C, Guinea Viniegra J, Sanchez-Arevalo Lobo VJ, Ramon y Cajal S, Sanchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene.* 2003 Jun 26;22(26):3998-4006.

183. Galan-Moya EM, de la Cruz-Morcillo MA, Llanos Valero M, Callejas-Valera JL, Melgar-Rojas P, Hernandez Losa J, et al. Balance between MKK6 and MKK3 mediates p38 MAPK associated resistance to cisplatin in NSCLC. *PLoS One.* 2011;6(12):e28406.

184. Wang Z, Xu J, Zhou JY, Liu Y, Wu GS. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8870-7.

185. Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Belda-Iniesta C,

Moratilla C, Cejas P, et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2006 Jun 1;25(23):3335-45.

186. Cortes-Sempere M, Chattopadhyay S, Rovira A, Rodriguez-Fanjul V, Belda-Iniesta C, Tapia M, et al. MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2009 Dec 28;286(2):206-16.

187. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989 May 12;244(4905):707-12.

188. Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhofer N, Meinert R, Arand M, et al. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 1999 Jul 1;59(13):3206-14.

189. Tsai CM, Chang KT, Perng RP, Mitsudomi T, Chen MH, Kadoyama C, et al. Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jun 2;85(11):897-901.

190. Calikusu Z, Yildirim Y, Akcali Z, Sakalli H, Bal N, Unal I, et al. The effect of HER2 expression on cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:97.

191. Fijolek J, Wiatr E, Rowinska-Zakrzewska E, Giedronowicz D, Langfort R, Chabowski M, et al. p53 and HER2/neu expression in relation to chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers.* 2006 Apr-Jun;21(2):81-7.

192. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):973-82.

193. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar;12(3):159-69.

194. Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, Machado-Pinilla R, Rodriguez-Fanjul V, Manguan-Garcia C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived

- deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2010 Mar 18;29(11):1681-90.
195. Cortes-Sempere M, de Miguel MP, Pernia O, Rodriguez C, de Castro Carpeno J, Nistal M, et al. IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFIR/Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2012 Apr 30.
196. Loriot Y, Mordant P, Deutsch E, Olausson KA, Soria JC. Are RAS mutations predictive markers of resistance to standard chemotherapy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Sep;6(9):528-34.
197. van Bakel H, Holstege FC. In control: systematic assessment of microarray performance. *EMBO Rep*. 2004 Oct;5(10):964-9.
198. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.
199. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13784-9.
200. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13790-5.
201. Hayes DN, Monti S, Parmigiani G, Gilks CB, Naoki K, Bhattacharjee A, et al. Gene expression profiling reveals reproducible human lung adenocarcinoma subtypes in multiple independent patient cohorts. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 1;24(31):5079-90.
202. Nacht M, Dracheva T, Gao Y, Fujii T, Chen Y, Player A, et al. Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15203-8.
203. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):816-24.
204. Raponi M, Zhang Y, Yu J, Chen G, Lee G, Taylor JM, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res*. 2006 Aug 1;66(15):7466-72.
205. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, Bowman RV, Hayward NK, Fong KM. Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2946-54.
206. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, Bowman R, Clarke BE, Hayward NK, et al. Expression profiling defines a recurrence signature in lung squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2007 Mar;28(3):760-6.
207. Xie Y, Xiao G, Coombes KR, Behrens C, Solis LM, Raso G, et al. Robust gene expression signature from formalin-fixed paraffin-embedded samples predicts prognosis of non-small-cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2011 Sep 1;17(17):5705-14.
208. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2007 Jan 4;356(1):11-20.
209. Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, Blackhall FH, Zhu CQ, Strumpf D, et al. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 10;25(35):5562-9.
210. Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Sanchez JJ, Mendez P, Rzyman W, et al. Three-gene expression signature predicts survival in early-stage squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4794-9.
211. Mitra R, Lee J, Jo J, Milani M, McClintick JN, Edenberg HJ, et al. Prediction of postoperative recurrence-free survival in non-small cell lung cancer by using an internationally validated gene expression model. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2934-46.
212. Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK, Zhu ZH, Gao W, Pham PT, et al. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet*. 2012 Mar 3;379(9818):823-32.
213. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung

- cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):189-98.
214. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):48-57.
215. Raponi M, Dossey L, Jatkoa T, Wu X, Chen G, Fan H, et al. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5776-83.
216. Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, et al. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med*. 2006 Dec;3(12):e467.
217. Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, Gerald WL, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):822-7.
218. Wan YW, Sabbagh E, Raese R, Qian Y, Luo D, Denvir J, et al. Hybrid models identified a 12-gene signature for lung cancer prognosis and chemoresponse prediction. *PLoS One*. 2010;5(8):e12222.
219. Boutros PC, Lau SK, Pintilie M, Liu N, Shepherd FA, Der SD, et al. Prognostic gene signatures for non-small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2824-8.
220. Subramanian J, Simon R. Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: ready for clinical use? *J Natl Cancer Inst*. 2010 Apr 7;102(7):464-74.
221. Subramanian J, Simon R. What should physicians look for in evaluating prognostic gene-expression signatures? *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jun;7(6):327-34.
222. Gemma A, Li C, Sugiyama Y, Matsuda K, Seike Y, Kosaihiira S, et al. Anticancer drug clustering in lung cancer based on gene expression profiles and sensitivity database. *BMC Cancer*. 2006;6:174.
223. Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, et al. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene*. 2003 Apr 10;22(14):2192-205.
224. Oshita F, Ikehara M, Sekiyama A, Hamanaka N, Saito H, Yamada K, et al. Genomic-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profile with chemoresistance in patients with advanced lung cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2004 Jul;4(2):155-60.
225. Zhu CQ, Ding K, Strumpf D, Weir BA, Meyerson M, Pennell N, et al. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4417-24.
226. Van Laar RK. Genomic signatures for predicting survival and adjuvant chemotherapy benefit in patients with non-small-cell lung cancer. *BMC Med Genomics*. 2012;5:30.
227. Casado E, Garcia VM, Sanchez JJ, Blanco M, Maurel J, Feliu J, et al. A combined strategy of SAGE and quantitative PCR Provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemoradiotherapy response and outcome in rectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):4145-54.
228. Polyak K, Riggins GJ. Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research. *J Clin Oncol*. 2001 Jun 1;19(11):2948-58.
229. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol*. 2004 Jan;164(1):35-42.
230. Suwinski R, Klusek A, Tyszkiewicz T, Kowalska M, Szczesniak-Klusek B, Gawkowska-Suwinska M, et al. Gene expression from bronchoscopy obtained tumour samples as a predictor of outcome in advanced inoperable lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(7):e41379.
231. Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2010 Apr;10(4):241-53.
232. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell

- type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Mar;8(3):443-50.
233. Drexler HG, Fombonne S, Matsuo Y, Hu ZB, Hamaguchi H, Uphoff CC. p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization? *Leukemia*. 2000 Jan;14(1):198-206.
234. Baguley BC, Marshall ES. In vitro modelling of human tumour behaviour in drug discovery programmes. *Eur J Cancer*. 2004 Apr;40(6):794-801.
235. Choy H PH, Rosell R, et al. Lung Cancer. In: Chang A GP, Hayes DF, et al editor. *Oncology: An Evidence-Based Approach*. New York, NY: Springer Science + Business Media, ; 2006. p. 545-621.
236. Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J Cancer*. 2004 Apr;40(6):802-20.
237. Pal SK, Figlin RA, Reckamp K. Targeted therapies for non-small cell lung cancer: an evolving landscape. *Mol Cancer Ther*. 2010 Jul;9(7):1931-44.
238. Gu F, Ma Y, Zhang Z, Zhao J, Kobayashi H, Zhang L, et al. Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2010 Mar;23(3):671-6.
239. Ooi AT, Mah V, Nickerson DW, Gilbert JL, Ha VL, Hegab AE, et al. Presence of a putative tumor-initiating progenitor cell population predicts poor prognosis in smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2010 Aug 15;70(16):6639-48.
240. Hu M, Ye L, Ruge F, Zhi X, Zhang L, Jiang WG. The clinical significance of Psoriasin for non-small cell lung cancer patients and its biological impact on lung cancer cell functions. *BMC Cancer*. 2012;12:588.
241. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, De Castro J, Espinosa E, Redondo A, et al. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control*. 2004 Sep;15(7):707-19.
242. Lader AS, Ramoni MF, Zetter BR, Kohane IS, Kwiatkowski DJ. Identification of a transcriptional profile associated with in vitro invasion in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*. 2004 Jul;3(7):624-31.
243. Moldvay J, Jackel M, Paska C, Soltesz I, Schaff Z, Kiss A. Distinct claudin expression profile in histologic subtypes of lung cancer. *Lung Cancer*. 2007 Aug;57(2):159-67.
244. Chang HH, Dreyfuss JM, Ramoni MF. A transcriptional network signature characterizes lung cancer subtypes. *Cancer*. 2011 Jan 15;117(2):353-60.
245. Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2011 Aug;32(4):641-6.
246. Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):165-78.
247. Srivastava MK, Andersson A, Zhu L, Harris-White M, Lee JM, Dubinett S, et al. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy*. 2012 Mar;4(3):291-304.
248. Dakir EH, Feigenbaum L, Linnoila RI. Constitutive expression of human keratin 14 gene in mouse lung induces premalignant lesions and squamous differentiation. *Carcinogenesis*. 2008 Dec;29(12):2377-84.
249. Xu Y, Cao LQ, Jin LY, Chen ZC, Zeng GQ, Tang CE, et al. Quantitative proteomic study of human lung squamous carcinoma and normal bronchial epithelial acquired by laser capture microdissection. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:510418.
250. Zeng GQ, Zhang PF, Deng X, Yu FL, Li C, Xu Y, et al. Identification of candidate biomarkers for early detection of human lung squamous cell cancer by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Jun;11(6):M111 013946.
251. Xu T, Wei Q, Lopez Guerra JL, Wang LE, Liu Z, Gomez D, et al. HSPB1 gene polymorphisms predict risk of mortality for US patients after radio(chemo)therapy for non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Oct 1;84(2):e229-35.
252. Zimmermann M, Nickl S, Lambers C, Hacker S, Mitterbauer A, Hoetzenecker K, et al. Discrimination of clinical stages in

- non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: a multi-institutional case-control study. *Clin Chim Acta*. 2012 Jul 11;413(13-14):1115-20.
253. Guo H, Bai Y, Xu P, Hu Z, Liu L, Wang F, et al. Functional promoter -1271G>C variant of HSPB1 predicts lung cancer risk and survival. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1928-35.
254. Ferraro B, Bepler G, Sharma S, Cantor A, Haura EB. EGR1 predicts PTEN and survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1921-6.
255. Shimoyamada H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Ishii J, Sakaeda M, et al. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor-A expression in lung cancer cells. *Am J Pathol*. 2010 Jul;177(1):70-83.
256. Kim JH, Choi DS, Lee OH, Oh SH, Lippman SM, Lee HY. Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1-mediated transcriptional events. *Blood*. 2011 Sep 1;118(9):2622-31.
257. Xu C, Xie D, Yu SC, Yang XJ, He LR, Yang J, et al. beta-Catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-I receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2013 May 15;73(10):3181-9.
258. Cortes-Dericks L, Galetta D, Spaggiari L, Schmid RA, Karoubi G. High expression of octamer-binding transcription factor 4A, prominin-1 and aldehyde dehydrogenase strongly indicates involvement in the initiation of lung adenocarcinoma resulting in shorter disease-free intervals. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Jun;41(6):e173-81.
259. Chen Z, Wang T, Cai L, Su C, Zhong B, Lei Y, et al. Clinicopathological significance of non-small cell lung cancer with high prevalence of Oct-4 tumor cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31:10.
260. Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, Franco R, La Rocca A, Liguori E, et al. Epithelial to mesenchymal transition by TGFbeta-1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PLoS One*. 2011;6(6):e21548.
261. Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res*. 2010 Dec 15;70(24):10433-44.
262. Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, O'Flaherty JD, et al. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One*. 2013;8(1):e54193.
263. Malusecka E, Krzyzowska-Gruca S, Gawrychowski J, Fiszer-Kierzkowska A, Kolosza Z, Krawczyk Z. Stress proteins HSP27 and HSP70i predict survival in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res*. 2008 Jan-Feb;28(1B):501-6.
264. Berrieman HK, Cawkwell L, O'Kane SL, Smith L, Lind MJ. Hsp27 may allow prediction of the response to single-agent vinorelbine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2006 Jan;15(1):283-6.
265. Kanagasabai R, Krishnamurthy K, Druhan LJ, Ilangoan G. Forced expression of heat shock protein 27 (Hsp27) reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated drug efflux and MDR1 gene expression in Adriamycin-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2011 Sep 23;286(38):33289-300.
266. Inoue Y, Matsumoto H, Yamada S, Kawai K, Suemizu H, Gika M, et al. ATP7B expression is associated with in vitro sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2010 Mar;1(2):279-82.
267. Ren J, Chen Y, Song H, Chen L, Wang R. Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. *J Cell Biochem*. 2013 Jun;114(6):1395-403.
268. Liu Y, Zhang N, Wang Y, Xu M, Liu N, Pang X, et al. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes invasion and bone metastasis of small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2012 Aug;103(8):1420-8.
269. Hui L, Zhang S, Dong X, Tian D, Cui Z, Qiu X. Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. *PLoS One*. 2013;8(4):e62171.

270. Pallier K, Cessot A, Cote JF, Just PA, Cazes A, Fabre E, et al. TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2012;7(1):e29954.
271. Jiang W, Pang XG, Wang Q, Shen YX, Chen XK, Xi JJ. Prognostic role of Twist, Slug, and Foxc2 expression in stage I non-small-cell lung cancer after curative resection. *Clin Lung Cancer*. 2012 Jul;13(4):280-7.
272. Jin HO, Hong SE, Woo SH, Lee JH, Choe TB, Kim EK, et al. Silencing of Twist1 sensitizes NSCLC cells to cisplatin via AMPK-activated mTOR inhibition. *Cell Death Dis*. 2012;3:e319.
273. Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, Zhang YS, Chen ZT. Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 May 16;369(4):1098-102.
274. Tiseo M, Bordi P, Bortesi B, Boni L, Boni C, Baldini E, et al. ERCC1/BRCA1 expression and gene polymorphisms as prognostic and predictive factors in advanced NSCLC treated with or without cisplatin. *Br J Cancer*. 2013 Apr 30;108(8):1695-703.
275. Jiang J, Liang X, Zhou X, Huang R, Chu Z, Zhan Q. ERCC1 expression as a prognostic and predictive factor in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Jun;39(6):6933-42.
276. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 15;14(6):1797-803.
277. Shi Y, Chen L, Li J, Lv YL, Sun Q, Wang LX, et al. Prognostic and predictive values of pERK1/2 and pAkt-1 expression in non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Tumour Biol*. 2011 Apr;32(2):381-90.
278. Benson LJ, Phillips JA, Gu Y, Parthun MR, Hoffman CS, Annunziato AT. Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):836-42.
279. Miyamoto N, Izumi H, Noguchi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, Shiota M, et al. Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):18218-26.
280. Li X, Corsa CA, Pan PW, Wu L, Ferguson D, Yu X, et al. MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Mol Cell Biol*. 2010 Nov;30(22):5335-47.
281. Sharma GG, So S, Gupta A, Kumar R, Cayrou C, Avvakumov N, et al. MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2010 Jul;30(14):3582-95.
282. Lee HS, Park JH, Kim SJ, Kwon SJ, Kwon J. A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *EMBO J*. 2010 Apr 21;29(8):1434-45.
283. Schneider M, Wortmann M, Mandal PK, Arpornchayanon W, Jannasch K, Alves F, et al. Absence of glutathione peroxidase 4 affects tumor angiogenesis through increased 12/15-lipoxygenase activity. *Neoplasia*. 2010 Mar;12(3):254-63.
284. Ding WQ, Lind SE. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr;6(4):1467-74.
285. Liang Y, O'Driscoll L, McDonnell S, Doolan P, Oglesby I, Duffy K, et al. Enhanced in vitro invasiveness and drug resistance with altered gene expression patterns in a human lung carcinoma cell line after pulse selection with anticancer drugs. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10;111(4):484-93.
286. Li J, Li ZN, Yu LC, Bao QL, Wu JR, Shi SB, et al. Association of expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 with outcome of patients with locally advanced non-small cell lung cancer who received neoadjuvant chemotherapy. *Lung Cancer*. 2010 Jul;69(1):116-22.
287. Wang L, Yue W, Zhang L, Zhao X, Wang Y, Xu S. mTOR and PTEN

- expression in non-small cell lung cancer: analysis by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Surg Today*. 2012 May;42(5):419-25.
288. Gately K, Al-Alao B, Dhillon T, Mauri F, Cuffe S, Seckl M, et al. Overexpression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and angiogenesis are poor prognostic factors in early stage NSCLC: a verification study. *Lung Cancer*. 2012 Feb;75(2):217-22.
289. Wangpaichitr M, Wu C, You M, Kuo MT, Feun L, Lampidis T, et al. Inhibition of mTOR restores cisplatin sensitivity through down-regulation of growth and anti-apoptotic proteins. *Eur J Pharmacol*. 2008 Sep 4;591(1-3):124-7.
290. Merikallio H, Kaarteenaho R, Paakko P, Lehtonen S, Hirvikoski P, Makitaro R, et al. Zeb1 and twist are more commonly expressed in metastatic than primary lung tumours and show inverse associations with claudins. *J Clin Pathol*. 2011 Feb;64(2):136-40.
291. Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, Virtanen I, Kataja V, Auvinen P, et al. Transcription factors zeb1, twist and snai1 in breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;11:73.
292. Zhao XL, Sun T, Che N, Sun D, Zhao N, Dong XY, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma metastasis through matrix metalloproteinase activation by epithelial-mesenchymal transition regulator Twist1. *J Cell Mol Med*. 2011 Mar;15(3):691-700.
293. Valdes-Mora F, Gomez del Pulgar T, Bandres E, Cejas P, Ramirez de Molina A, Perez-Palacios R, et al. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 Jan;16(1):78-87.
294. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2003 Jan 15;34(2):145-69.
295. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*. 2002 Sep;122(3):1037-57.
296. Jeremic B, Milicic B, Dagovic A, Aleksandrovic J, Nikolic N. Pretreatment clinical prognostic factors in patients with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Feb;129(2):114-22.
297. Bauml J, Mick R, Zhang Y, Watt CD, Vachani A, Aggarwal C, et al. Determinants of Survival in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in the Era of Targeted Therapies. *Clin Lung Cancer*. 2013 Jul 1.
298. Hirsch FR, Spreafico A, Novello S, Wood MD, Simms L, Papotti M. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. *J Thorac Oncol*. 2008 Dec;3(12):1468-81.
299. Finkelstein DM, Ettinger DS, Ruckdeschel JC. Long-term survivors in metastatic non-small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 1986 May;4(5):702-9.
300. Hoang T, Dahlberg SE, Schiller JH, Johnson DH. Does histology predict survival of advanced non-small cell lung cancer patients treated with platin-based chemotherapy? An analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Study E1594. *Lung Cancer*. 2013 Jul;81(1):47-52.
301. Zhong C, Liu H, Jiang L, Zhang W, Yao F. Chemotherapy plus best supportive care versus best supportive care in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2013;8(3):e58466.
302. Shanafelt TD, Loprinzi C, Marks R, Novotny P, Sloan J. Are chemotherapy response rates related to treatment-induced survival prolongations in patients with advanced cancer? *J Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1966-74.
303. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 Jan;3(1):24-40.
304. Mullins M, Perreard L, Quackenbush JF, Gauthier N, Bayer S, Ellis M, et al. Agreement in breast cancer classification between microarray and quantitative reverse transcription PCR from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Clin Chem*. 2007 Jul;53(7):1273-9.
305. Sanchez-Navarro I, Gamez-Pozo A, Gonzalez-Baron M, Pinto-Marin A,

- Hardisson D, Lopez R, et al. Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. *Biotechniques*. 2010 May;48(5):389-97.
306. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, et al. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest*. 2005 Aug;85(8):1040-50.
307. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817-26.
308. Zanetti-Dallenbach R, Vuaroqueaux V, Wight E, Labuhn M, Singer G, Urban P, et al. Comparison of gene expression profiles in core biopsies and corresponding surgical breast cancer samples. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R51.
309. Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1995;50:191-224.
310. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC. Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res*. 2002 Feb 1;62(3):827-34.
311. Pagel JI, Deindl E. Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem Biophys*. 2011 Aug;48(4):226-35.
312. Levin WJ, Press MF, Gaynor RB, Sukhatme VP, Boone TC, Reissmann PT, et al. Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene*. 1995 Oct 5;11(7):1261-9.
313. McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2002 Apr;8(4):1127-38.
314. Brown KC, Lau JK, Dom AM, Witte TR, Luo H, Crabtree CM, et al. MG624, an alpha7-nAChR antagonist, inhibits angiogenesis via the Egr-1/FGF2 pathway. *Angiogenesis*. 2012 Mar;15(1):99-114.
315. Bai J, Hu S. Transcriptome network analysis reveals potential candidate genes for squamous lung cancer. *Int J Mol Med*. 2012 Jan;29(1):95-101.
316. Chou CH, Cheng YF, Siow TY, Kumar A, Peck K, Chang C. SCUBE3 regulation of early lung cancer angiogenesis and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Feb 19.
317. Zwang Y, Oren M, Yarden Y. Consistency test of the cell cycle: roles for p53 and EGR1. *Cancer Res*. 2012 Mar 1;72(5):1051-4.
318. Quinones A, Dobberstein KU, Rainov NG. The egr-1 gene is induced by DNA-damaging agents and non-genotoxic drugs in both normal and neoplastic human cells. *Life Sci*. 2003 May 16;72(26):2975-92.
319. Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 15;90(6):2419-22.
320. Park JO, Lopez CA, Gupta VK, Brown CK, Mauceri HJ, Darga TE, et al. Transcriptional control of viral gene therapy by cisplatin. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):403-10.
321. Dong Q, Zhang J, Hendricks DT, Zhao X. GRObeta and its downstream effector EGR1 regulate cisplatin-induced apoptosis in WHCO1 cells. *Oncol Rep*. 2011 Apr;25(4):1031-7.
322. Voena C, Di Giacomo F, Panizza E, D'Amico L, Boccalatte FE, Pellegrino E, et al. The EGFR family members sustain the neoplastic phenotype of ALK+ lung adenocarcinoma via EGR1. *Oncogenesis*. 2013;2:e43.
323. Sun Y, Li T, Ma K, Tian Z, Zhu Y, Chen F, et al. The impacts of ERCC1 gene exon VIII alternative splicing on cisplatin-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Invest*. 2009 Nov;27(9):891-7.
324. Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL, et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells.

- Anticancer Res. 2000 Mar-Apr;20(2A):645-52.
325. Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD, Koberle B. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer*. 2004 Jun 20;110(3):352-61.
326. Damia G, Guidi G, D'Incalci M. Expression of genes involved in nucleotide excision repair and sensitivity to cisplatin and melphalan in human cancer cell lines. *Eur J Cancer*. 1998 Oct;34(11):1783-8.
327. Shimizu J, Horio Y, Osada H, Hida T, Hasegawa Y, Shimokata K, et al. mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. *Respirology*. 2008 Jun;13(4):510-7.
328. Dan S, Tsunoda T, Kitahara O, Yanagawa R, Zembutsu H, Katagiri T, et al. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2002 Feb 15;62(4):1139-47.
329. Okuda K, Sasaki H, Dumontet C, Kawano O, Yukiue H, Yokoyama T, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 and class III beta-tubulin predict survival after chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008 Oct;62(1):105-12.
330. Seyhan EC, Altin S, Cetinkaya E, Sokucu S, Abali H, Buyukpinarbasili N, et al. Prognostic significance of ERCC1 expression in resected non small cell lung carcinoma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;17(2):110-7.
331. Vilmar AC, Santoni-Rugiu E, Sorensen JB. ERCC1 and histopathology in advanced NSCLC patients randomized in a large multicenter phase III trial. *Ann Oncol*. 2010 Sep;21(9):1817-24.
332. Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, Li X, Zheng Z, Boulware D, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5808-15.
333. Friboulet L, Barrios-Gonzales D, Commo F, Olaussen KA, Vagner S, Adam J, et al. Molecular Characteristics of ERCC1-Negative versus ERCC1-Positive Tumors in Resected NSCLC. *Clin Cancer Res*. 2011 Sep 1;17(17):5562-72.
334. Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 21;368(12):1101-10.
335. Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell*. 2003 Dec;12(6):1489-98.
336. Rageul J, Fremin C, Ezan F, Baffet G, Langouet S. The knock-down of ERCC1 but not of XPF causes multinucleation. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Sep 5;10(9):978-90.
337. Kamileri I, Karakasilioti I, Sideri A, Kostas T, Tatarakis A, Talianidis I, et al. Defective transcription initiation causes postnatal growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):2995-3000.
338. Besse B, Olaussen KA, Soria JC. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1050-60.
339. Stinchcombe TE, Socinski MA. Considerations for second-line therapy of non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2008;13 Suppl 1:28-36.
340. Ikehara M, Oshita F, Sekiyama A, Hamanaka N, Saito H, Yamada K, et al. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profile with survival in patients with advanced lung cancer. *Oncol Rep*. 2004 May;11(5):1041-4.
341. Baty F, Facompre M, Kaiser S, Schumacher M, Pless M, Bubendorf L, et al. Gene profiling of clinical routine biopsies and prediction of survival in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jan 15;181(2):181-8.
342. Blackhall FH, Wigle DA, Jurisica I, Pintilie M, Liu N, Darling G, et al. Validating the prognostic value of marker genes derived from a non-small cell lung cancer microarray study. *Lung Cancer*. 2004 Nov;46(2):197-204.
343. Casado E, Garcia VM, Sanchez JJ, Gomez Del Pulgar MT, Feliu J, Maurel J, et al. Upregulation of trefoil factor 3 (TFF3) after rectal cancer chemoradiotherapy is an

adverse prognostic factor and a potential
therapeutic target. *Int J Radiat Oncol Biol
Phys.* 2012 Dec 1;84(5):1151-8.

Clave de abreviaturas

Clave de abreviaturas (por orden alfabético):

ADNc: ADN complementario

APE1: del inglés *apurinic/apirimidinic endonuclease 1*: endonucleasa apurínica/apirimidínica 1.

ARNm: ARN mensajero

BASC: del inglés *BRCA1-associated genome surveillance complex*, complejo de vigilancia genómica asociado a BRCA-1

BER: del inglés *Base-excision repair*, reparación del ADN por escisión de bases

BRCA-1: del inglés breast cancer-1, proteína del cáncer de mama 1.

CALGB: del inglés Cancer and Leukemia Group B, grupo cooperativo internacional que ha liderado diversos ensayos clínicos en CPNM y otras neoplasias.

CArg: secuencia de consenso CC(A/T)₆GG.

CDK: del inglés *cyclin-dependent kinase*, kinasa dependiente de ciclina.

CEA: Del inglés *carcinoembryonic antigen*, antígeno carcinoembrionario

ChIP-seq: del inglés *chromatin immunoprecipitation sequencing*, secuenciación por inmunoprecipitación de la cromatina.

COX-2: ciclooxigenasa 2.

CP: Cáncer de pulmón

CPM: Cáncer de pulmón microcítico.

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico

Ct: del inglés *threshold cycle*, ciclo umbral.

DDH: dihidrodiol deshidrogenasa

ECOG: Escala Eastern Cooperative Oncology Group para la evaluación del estado general del paciente oncológico.

EE: estabilización de la enfermedad

EGFR: Del inglés *epithelial growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGR1: del inglés *early growth response-1*, elemento de respuesta temprana de crecimiento 1.

EML4-ALK: proteína de fusión presente en algunos tipos de CPNM, procedente del oncogén EML4-ALK. Dicho gen está formado por el gen de la proteína similar equinodérmica asociada a microtúbulos 4 (EML-4) y el de la kinasa del linfoma anaplásico (ALK).

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERCC1: del inglés *excision-repair cross-complementation group 1*, proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1.

ERK: del inglés *extracellular signal-regulated kinases*, kinasas reguladas por señales extracelulares

FACS: del inglés *fluorescence-activated cell sorting*, selección de células activada por fluorescencia.

FGF: del inglés *fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos.

FRAP-1: ver MTOR.

GG-NER: del inglés *global genome nucleotide excision repair*, reparación por excisión de nucleótidos del genoma global.

GTP: Guanosin trifosfato

GTS: glutatión-S-transferasa.

GWAS: del inglés *genome-wide association studies*, estudios de asociación del genoma completo

HER2: del inglés *human epithelial growth factor receptor 2*, receptor 2 del factor de crecimiento hepitelial humano, también conocido como ErbB2 o Neu.

HIF-1 α : del inglés *hypoxia inducible factor alpha*, factor alfa inducible por hipoxia.

HR: del inglés *hazard ratio*, razón de riesgo.

IALT: del inglés *International Adjuvant Lung Cancer Trial*, ensayo clínico internacional de adyuvancia en cáncer de pulmón.

IAP: proteína inhibidora de la apoptosis.

IC50: del inglés *inhibitory concentration 50*, concentración de un compuesto capaz de eliminar al 50% de las células con respecto al control

IGF: del inglés *insulin-like growth factor*, factor de crecimiento similar a la insulina.

IGFBP3: del inglés *insulin growth factor binding protein 3*, proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina

IGF1R: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1.

JBR.10: Ensayo clínico en adyuvancia de CPNM resecao conducido por el Instituto Nacional de Cáncer de Canadá y otros grupos cooperativos internacionales.

JNK: kinasa c-Jun-N-terminal

MAPK: Proteína-kinasa activada por mitógenos

MEC: Matriz extracelular

miRNA: microARN.

MKK: MAPK kinasa.

MKP1: fosfatasa 1 de la MAPK kinasa, también conocida como CL100.

MMP: del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteínasa de la matriz.

MMR: del inglés *mismatch repair*, reparación de errores en el apareamiento de bases.

MRP: del inglés *multidrug resistant proteins*, proteínas de resistencia múltiple a drogas.

MDR1: del inglés *multidrug resistance protein 1*, proteína de resistencia múltiple a drogas 1, también conocida como ABCB1

MTOR: del inglés *mechanistic target of rapamycin*, proteína diana mecánica de la rapamicina. También conocido como FRAP-1.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NER: del inglés *nucleotide excision repair*, reparación por escisión de nucleótidos.

NF-κB: factor nuclear kappa B.

NPRL2: del inglés, *nitrógeno-permease regulador-like 2*, proteína similar al regulador de la permeabilidad del nitrógeno 2.

OCT: del inglés *optimal cutting temperature compound*, resina para el corte óptimo a temperatura (resina crioprotectora)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: del inglés *plasminogen activator*, activador del plasminógeno.

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: del inglés *platelet-derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: Progresión de la enfermedad.

PET-TC: Tomografía por emisión de positrones acoplada a tomografía computarizada.

PI3K: fosfatidil-inositol-3 kinasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, también conocida como qRT-PCR.

RC: respuesta completa

RECIST: del inglés *response evaluation criteria in solid tumors*, criterios de evaluación de respuesta (radiológicos) en tumores sólidos.

RNM: resonancia nuclear magnética.

RP: respuesta parcial

RRM1: ribonucleótido reductasa M1.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

SAGE: del inglés *serial analysis of gene expression*, análisis seriado de la expresión génica.

SG: supervivencia global

siRNA: ARN interferente.

SILAC: del inglés *stable isotope labelling by/with aminoacids in cell culture*, marcado estable de isótopos por/con aminoácidos en cultivo celular.

SLP: supervivencia libre de progresión

SNP: del inglés *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleótido simple.

TC: tomografíaa computarizada.

TC-NER: del inglés *transcription coupled nucleotide excision repair*, reparación por excisión de nucleótidos acoplada a la transcripción.

TGFBI: del inglés *transforming growth factor beta-induced*, proteína inducida por el factor de crecimiento transformante beta.

TIMP: del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinase*, inhibidor tisular de metaloproteinasa.

TNF: de inglés *tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral

TNM: Sistema de Estadificación basado en las características anatomopatológicas del tumor (T: Tamaño; N: Afectación Ganglionar; M: Metástasis).

TR: Tasa de respuesta (a un tratamiento).

TTF-1: del inglés *tyroid transcription factor-1*, factor 1 de transcripción tiroidea.

VEGF: del inglés *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGFR: del inglés *vascular endothelial growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

XPF: del inglés *xeroderma pigmentosum complementation group F*, factor complementario del grupo F del xeroderma pigmentoso.